

Aus der
II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Neukölln
Berlin - Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

**VERÄNDERUNGEN DER MORPHE
UND DER LOKOMOTION VON LEUKOCYTEN
DURCH CYTOCHALASIN D UND E
IM PHASENKONTRASTZEITRAFFERFILM**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jürgen Helmut Lichter
aus Mannheim

1905



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548822_0021

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Neukölln
Berlin - Neukölln

Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

VERÄNDERUNGEN DER MORPHE UND DER LOKOMOTION VON LEUKOCYTEN
DURCH CYTOCHALASIN D UND E IM PHASENKONTRASTZEITRAFFERFILM

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jürgen Helmut Lichter
aus Mannheim

Referent: Prof. Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. med. G. Bogusch

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 7.10.85

Inhalt

Einleitung

- Bewegung von Zellen und Lokomotion von Leukocyten im Phasenkontrast 4
- Cytoskelett und molekularbiologische Mechanismen der amöboiden Bewegung 6
- Cytochalasine: Struktur und Wirkung auf Zellmorphie und kontraktiles System von Nichtmuskel-Zellen (NMZ) 18

Problemstellung 24

Material und Methode 25

Ergebnisse 29

Diskussion 70

Zusammenfassung 77

Anhang

- Herstellung der Lösungen 79
- Zusammenstellung der Mikroskopdaten 80
- Berechnung der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Leukocyten, Standardabweichung, lineare Regression, Bestimmtheitsmaß 81
- Einzelzellgeschwindigkeiten von Leukocyten in Abhängigkeit von der Cytochalasin D-Konzentration im Agar 84
- Einzelzellgeschwindigkeiten von Leukocyten in Abhängigkeit von der Cytochalasin E-Konzentration im Agar 99
- Zeitdauer der "blister"-Phasen 110

Literatur 113

Einleitung

Bewegung von Zellen und Lokomotion von Leukocyten im Phasenkontrast^{10, 13, 55, 79}

Bewegung ohne Ortsveränderung der Zelle (wie Cytoplasmaströmung, Bewegung von Zellorganellen, Pseudopodienbildung) wird unterschieden von Bewegung mit Ortsveränderung der Zelle (Lokomotion). Lokomotion kann aktiv (Motilität) oder passiv erfolgen, sie kann ungerichtet (Kinese, random movement) oder gerichtet (Migration) erfolgen. Die Migration kann je nach dem sie auslösenden Reiz (Taxis) charakterisiert werden (Chemotaxis, Galvanotaxis usw.).¹⁷

Der jeweilige Zellfunktionszustand, wie z.B. die Lokomotion, ist in der Zellkultur abhängig von drei Variablen: Zelltyp, Substrat und Medium. Ob Lokomotion erfolgt, hängt ab von den an der Zelloberfläche gegebenen Bedingungen. Substratkontakt ist Voraussetzung für die Lokomotion.

Ob Adhäsion und Ausbreiten (spreading) erfolgt, und mit welcher Geschwindigkeit dies geschieht, hängt von der Struktur des Substrats ab, aber auch vom Medium, das das "microenvironment" der Zelle wesentlich bestimmt (Temperatur, pH, Ionenkonzentrationen usw.). Bei einem pH-Wert größer als 8 ist kein Ausbreiten der Zelle möglich, bei einem pH-Wert kleiner als 6 "erstarrt" das Cytoplasma und die Zellen sind "gelähmt".

Allein schon durch einen pH-Gradienten kann eine Lokomotion ausgelöst werden. Die möglichen Zellfunktionen hängen vom Zelltyp ab.⁷⁷

Eukaryonten dienen Zilien- und Geißelbewegungen der Fortbewegung im flüssigen Medium, die amöboide Bewegung der auf festem Untergrund. Die amöboide Bewegung ist gekennzeichnet durch die vorübergehende Ausbildung von cytoplasmatischen Zellausläufern (Pseudopodien). Pseudopodien können zwar in jedem Milieu ausgebildet werden, doch nur auf festem Untergrund resultiert eine Lokomotion. Leukocyten sind durch eine amöboide Lokomotion charakterisiert (deBruyn, 1947).^{21a} Granulocyten zeigen, im Gegensatz zu Lymphocyten, auch Chemotaxis. Durch bestimmte Substanzen ist es möglich,

gezielt die Eosinophilen-Migration zu induzieren.²⁶ Chemotaxis beeinflusst jedoch nur die Richtung der Lokomotion, nicht die Geschwindigkeit.⁵⁷

Die Bewegungsformen von Granulocyten können im Phasenkontrast nach Rind⁵⁹ in drei Typen eingeteilt werden, je nach Lage des Zellkerns zum granulahaltigen Cytoplasma in Bezug auf die Bewegungsrichtung:

Beim I. Typ liegt der Kern zentral in einem mit Granula ausgefüllten Cytoplasma,

beim II. Typ im hinteren Zellteil mit Granula im mittleren und einer granulafreien Zone im vorderen Zellteil,

beim III. Typ folgt der Kern unmittelbar der vorderen granulafreien Zone.

Die Zellform während der Lokomotion wird wesentlich von den Pseudopodien bestimmt, die zungenförmig, sägeblattartig, blasig usw. sein können, und Kriterium für eine weitere Untergliederung nach von^{51c}

Philipsborn sind.⁶⁹ Granulocyten schieben zuerst einen Plasmaschleier mit gekräuseltem Rand vor (Lamellipodium). Das Cytoplasma in der Randregion erstarrt und legt die neue Zellgrenze fest. Durch eine ringförmige Region am Übergang dieses Pseudopodium in das "zurückgebliebene"

Cytoplasma strömen zuerst Granula, dann auch der Zellkern in den Zellausläufer. Während die Granula in der Peripherie relativ unbeweglich sind, zeigen die im zentralen Cytoplasma lebhaftere Bewegung. Die fadenförmigen Cytoplasmaausläufer am Uropoden am Zellende lösen sich erst in der letzten Phase der Lokomotion abrupt von der Unterlage. Granulocyten sind in ständiger Lokomotion. Pausen von bis zu 60 s wurden beobachtet.^{35 a}

Bei Lymphocyten unterscheidet Rind drei Bewegungstypen: den scheinbar bewegungslosen Typ I, Typ II mit reger Oberflächenbewegung und den sich fortbewegenden Typ III. Lymphocyten vom Typ III wandern manchmal in typischer Handspiegelform (Lewis, 1931),^{40a} weisen aber immer einseitige plumpe Cytoplasma-Ausstülpungen auf.⁶⁹

Der Zellkern liegt im vorderen, eventuell mittleren Teil der Zelle hinter dem hyalinen Pseudopodium (bulging bleb) und vor dem granulahaltigen "Schwanz"

mit Stromlinien (streamers).⁵¹ Zwischen Phasen mit Lokomotion sind bisweilen lange Ruhepausen eingeschaltet.^A

Bei Monocyten können Undulationen der breiten membranähnlichen Cytoplasmasäume, sowie lange Cytoplasmafortsätze beobachtet werden.⁶⁹

Zellkern und Granula bleiben in der Zellmitte. Während der Lokomotion haben sie, wie die Granulocyten, ein führendes Lamellipodium.^{31 a}

Cytoskelett und molekularbiologische Mechanismen der amöboiden Bewegung^{1, 23, 36, 39, 50, 54, 1a}

Intracelluläre Organisation und Aufrechterhaltung der Zellform sowie ihre Anpassung an den jeweiligen Funktionszustand der Zelle sind Funktionen des Cytoskeletts. Seine Hauptbestandteile sind Actin-Mikrofilamente, intermediäre Filamente und Mikrotubuli, denen verschiedene andere Proteine assoziiert sind. Mikrotubuli sind Hauptbestandteil der Geißel- und Zilienbewegung zugrundeliegenden Strukturen, Mikrofilamente in permanenter Form Hauptbestandteil der der Muskelkontraktion, in temporärer Form der der amöboiden Bewegung von Nichtmuskel-Zellen zugrundeliegenden Strukturen. Als integrale Bestandteile des Cytoskeletts sind die Centriolen-assoziierten Mikrotubuli und die Membran-assoziierten Mikrofilamente jedoch in ihren Funktionen eng miteinander verknüpft.

In Abhängigkeit von Zellzyklus und Funktionszustand der Nichtmuskel-Zellen werden die Actinfilamente in unterschiedlichem Ausmaß und in unterschiedlichen Bereichen des Cytoplasmas nach Bedarf gebildet und wieder aufgelöst.

Die spontane Polymerisation zu F-Actin erfolgt in vitro sobald die für jeden Actin-Typ spezifische kritische Konzentration in der Lösung überschritten wird unter Hydrolyse von ATP; der langsamen geschwindigkeitsbestimmenden Nukleation folgt die schnelle Filament-Verlängerung bis

zum Erreichen einer der Monomerkonzentration entsprechenden Fließgleichgewichts. Die Filamentverlängerung erfolgt an den beiden Filamentenden mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Nach Bindung von HMM- oder SI-Myosinfragmenten bilden die Actinfilamente Strukturen aus, die elektronenmikroskopisch als Pfeilspitzen-Muster (arrow heads) imponieren, mit einem spitzen Ende (pointed end) mit langsamer und einem gefiederten Ende (barbed end) mit schneller Monomerassoziation. Wegen unterschiedlicher Gleichgewichtskonstanten für beide Enden, d.h. verschiedener kritischer Konzentration, kommt es im Fließgleichgewicht zur Netto-Polymerisation an einem Ende (dem gefiederten Ende) und zur Netto-Depolymerisation am anderen (dem spitzen Ende) mit einem ständigen Fluß von G-Actin-Untereinheiten vom spitzen Ende zum gefiederten (head to tail polymerization, tread-milling).^{53,76} Die Polymerisation kann durch verschiedene Proteine von beiden Filamentenden her kontrolliert werden. In Erythrocyten sind Actin-Oligomere an Spektrin gebunden, das über Ankyrin an einem Glykoprotein der Zellmembran verankert ist.⁸ Die Bindung des spitzen langsam wachsenden Endes an das Spektrin-Tetramer "schützt" dieses Ende hoher kritischer Konzentration, und damit im Fließgleichgewicht Netto-depolymerisierende Ende, vor der Depolymerisation. Dadurch werden die Actin-Oligomere durch Senkung der kritischen Konzentration stabilisiert und die Polymerisationsgeschwindigkeit durch Bereitstellung von Nukleationszentren für die schnelle Verlängerungsreaktion erhöht.^{4,18} Durch die Membranverankerung des spitzen Endes wird die strukturelle Filamentpolarität und damit die Richtung der möglichen Kontraktion festgelegt, bzw. die Ausrichtung des Filamentnetzes (Gelierung, Sol-Gel-Transformation) an der Cytoplasmaseite der Zellmembran festgelegt.^{18,52} Die Gelierung von Cytoplasmaextrakten (Vernetzung) aus Actinfilamenten und Bindeproteinen erfolgt in vitro nach Erhöhung der Ionenkonzentration

der Lösung. Filamin aus glatten Muskelzellen und Actin-bindendes Protein (ABP) aus Makrophagen und Leukocyten sind an der Ausbildung eines Filamentbündelnetzes beteiligt, das strukturell dem hyalinen Ektoplasma eines Pseudopoden gleicht. Es konnte durch Fluorescein-markierte IgG-Ak an der Cytoplasmaoberfläche der Zellmembran von Granulocyten lokalisiert werden und scheint durch die Auslösung der Vernetzung die Ausbildung von Pseudopodien zu kontrollieren.¹⁴ Durch chemische Veränderung des Actinmoleküls kann *in vitro* eine Vernetzung verhindert werden.⁷² Die Wirkung von Villin aus intestinalen Epithelzellen ist von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig: bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration erfolgt Vernetzung, bei hoher wird die Vernetzung aufgrund der Blockierung des gefiederten schnell wachsenden Filamentendes verhindert, und es werden kürzere Filamente gebildet, da die kritische Konzentration höher liegt (für die Polymerisation steht nur noch das spitze langsam wachsende Ende zur Verfügung). Gelsolin aus Makrophagen verhindert die Vernetzung nach demselben Mechanismus, ebenso Profilin, Ca^{2+} -Konzentrationsunabhängig.^{61,74,75} Die Vernetzung setzt offensichtlich ein bestimmtes Ausmaß der Polymerisation voraus. Unter Kontrolle der interfilamentären Abstände durch Fimbrin in den Filamentnetzen im Bürstensaum⁴⁵ werden die tight junctions geöffnet und geschlossen.⁴⁷ Durch die Wirkung von Polymerisations-Inhibitoren, wie Profilin, kann das Ausbleiben der Polymerisation, trotz intracellulär weit über der kritischen Konzentration liegenden G-Actin-Konzentration erklärt werden. Anders als im Sarkomer, in dem die Actinfilamente in stabiler Form vorliegen, und lediglich der Gleitmechanismus zwischen Actin- und Myosinfilamenten durch Tropomyosin-Troponin mittels Ca^{2+} als elektromechanischem Koppler kontrolliert werden kann, ist bei den Nichtmuskel-Zellen zusätzlich eine Kontrolle der Actinfilament-abhängigen Funktionen über die Bildung und Auflösung von Mikrofilamenten möglich.

Erst die Zugabe von Myosin zu einer Lösung aus Filamentnetzen initiiert eine strömende Bewegung des Gel, die der von Amöbenextrakten gleicht. Aus den meisten Nichtmuskel-Zellen konnte Myosin isoliert werden. Im Gegensatz zu den Nichtmuskel-Zell-Actinen bestehen zwischen den Nichtmuskel-Zell-Myosinen erhebliche Unterschiede hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften, die hauptsächlich auf strukturelle Abweichungen im "Schwanzbereich" des Moleküls zurückzuführen sind. Diesem C-terminalen Ende des Moleküls (LMM) ist die Aggregatbildung unter physiologischen Bedingungen mit anderen Myosin-Molekülen zuzuschreiben, während dem N-terminalen Ende der "Kopfregion" (HMM), aufgrund seiner Actin-aktivierbaren ATPase Aktivität, die Aufgabe der Wechselwirkung mit Actinfilamenten zukommt. Seine Fähigkeit aus dem Myosinfilament herausschwingen zu können macht ein gerichtetes Gleiten auf den polaren Actinfilamenten möglich. Alle aus Nichtmuskel-Zellen isolierten Myosine zeigen in vitro eine Actin-aktivierbare ATPase Aktivität und die Fähigkeit in Abhängigkeit von ATP, Temperatur, pH-Wert und K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} -Konzentration in der Lösung, reversible Bindungen mit Actinfilamenten einzugehen. In einigen Zellen liegen sie jedoch nur als unipolare Filamente oder als Monomere vor und benötigen für die Actinfilament-Bindung einen Cofaktor. Ein Gleitmechanismus mit Actinfilamenten, und damit eine Kontraktion, ist auch mit unipolaren Myosinfilamenten möglich,⁶⁶ wobei die Gleitrichtung durch die Orientierung der polaren Actinfilamente festgelegt ist. Auch für "einköpfige" Monomere ist nach Bindung ihrer "Schwanzregion" z.B. an einem benachbarten Actinfilament, ein Gleiten denkbar. Troponin als Regulator dieses Gleitmechanismus konnte nur in Ausnahmefällen aus Nichtmuskel-Zellen isoliert werden, trotz Ca^{2+} -Abhängigkeit der Kontraktion. Eine Kontrolle durch Phosphorylierung der leichten Kette des Myosinmoleküls durch eine Calmodulin-abhängige Kinase als Cofaktor ist in vitro möglich.⁶³

Änderungen der Zellmorphie und des cytoplasmatischen Filamentmusters sind für die jeweilige Phase der Zell-Substrat-Wechselwirkung charakteristisch.

In der Zellkultur zeigen suspendierte Granulocyten im Phasenkontrast eine abgerundete Zellform, in der SEM ist ihre Zelloberfläche gleichmäßig mit Membranfalten bedeckt. Nach Adsorption der Zelle an das Substrat führt der Oberflächenkontakt zur Extension von Pseudopodien (Filopodien) und zum Anhaften der Zelle (attachment). Im Folgenden breitet sich die Zelle auf der Oberfläche aus (spreading), indem an den Haftpunkten Pseudopodien mit sich kräuselnder Kante ausgehen (Lamellipodien, ruffles), und neue Kontaktpunkte herstellen. Die Lamellipodien stellen sich lichtmikroskopisch dar als ein Schleier von hyalinem Cytoplasma, frei von Zellorganellen, in der gesamten Zellcircumferenz. Die Zelle flacht sich ab. Mit dem Oberflächenkontakt wird ein auf die Cytoplasmaseite der ventralen (substratanliegenden) Zellmembran beschränktes kortikales mikrotrabekuläres Netz aus subplasmalemmalen Filamentbündeln ausgebildet (dorsale kortikale Mikrofilament-Scheide, DCMS), die von globulären Zentren der Membran radiär ausgehen. Hauptbestandteile dieses Netzes sind Mikrofilamentbündel (stress fibers), die mit Mikrotubuli und anderen Filamenten in enger Verbindung stehen.⁶² Die Filamentbündel verlängern sich mit dem sich ausbreitenden Zellrand. Sie strahlen radiär von der perinukleären Region in die Haftpunkte ein und stehen dort mit dem dichten feineren Mikrofilamentnetz der Pseudopodien (Lamellipodien) in Verbindung, das in seiner Konsistenz dem Cytoplasmagel aus Actin und ABP gleicht. Nach Retraktion der Zelle, bei der die Granula von der gesamten Zellmembran zurückgezogen werden und in das Lamellipodium einströmen, beginnt die Zelle mit ihrer amöboiden Fortbewegung. Während der Lokomotion sind keine stress fibers erkennbar, stattdessen in der Circumferenz Bänder (arcs) langer Filamente zusammen mit Bündeln dickerer Myosinfilamente. An diesen Stellen erfolgt eine Lösung der Zelle vom Substrat.¹⁶

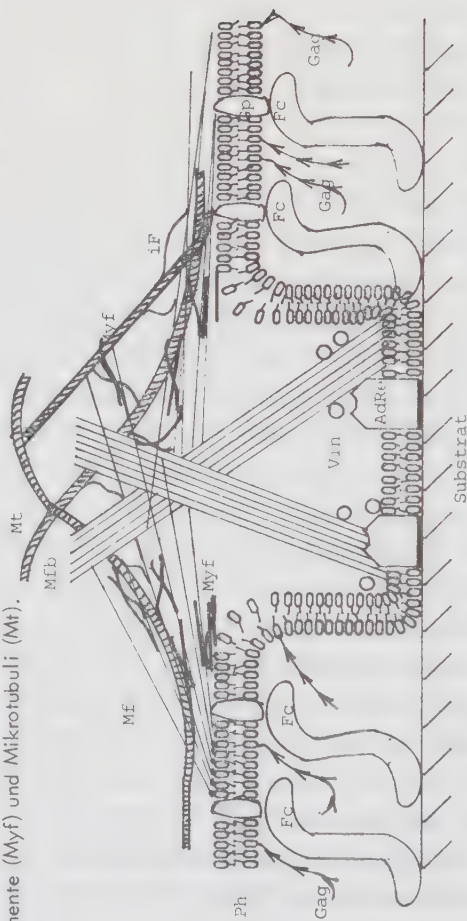
An Fibroblasten konnten dieselben Beobachtungen gemacht werden. Während der Lokomotion wanderten ununterbrochen "Bögen" (arcs) von dem führenden Lamellipodium zum Zellkern, die zunächst als aufeinanderfolgende Kontraktionszonen im kortikalen Filamentnetz gedeutet wurden⁶⁸, aber wohl lediglich durch das Verschieben der Zelle verursachte Verdichtungszone der DCMS sind.³²

Zeigen Präzipitate aus ruhenden Thrombocyten eine granuläre Struktur mit einzelnen kurzen Mikrofilamenten, so bestehen die Präzipitate aus aktivierten Thrombocyten (mit Filopodien) überwiegend aus Mikrofilament-Bündeln, die teilweise eine Netzstruktur bilden.³⁰ Das ADP-induzierte Ausbreiten (spreading) von Megakaryocyten in Kultur ist mit einer Umverteilung von diffus im Cytoplasma der suspendierten Zelle verteilten Actin, Myosin, α -Actinin, Filamin und Tubulin verbunden: Immunfluoreszenzmikroskopisch kann eine Konzentrierung von Actin, Filamin und Myosin in den Lamellipodien beobachtet werden, von α -Actinin in einer bogenförmigen flachen Cytoplasmazone, die an das Lamellipodium angrenzt, und von Tubulin im gesamten Cytoplasma, außer in den Lamellipodien. Im späteren Stadium konzentriert sich Myosin in der flachen Cytoplasmazone hinter dem Lamellipodium und in zirkulärer Anordnung um den Kern. Am Rand des Lamellipodium fehlt Myosin stets.³³ Im Bereich der flachen Cytoplasmazone hinter dem Lamellipodium, dem Haftpunkt der Zelle am Substrat, sind die Actinfilamente vermutlich mittels α -Actinin verankert, während das freie Ende den Rand des Lamellipodium verschiebt (ruffling).⁴⁰ α -Actinin bindet die Filamente jedoch nicht direkt an die Membran, sondern scheint die Anheftung eher durch seine Fähigkeit zur Brückenbildung zwischen benachbarten Actinfilamenten zu stabilisieren.²² Die beschriebenen Veränderungen des Cytoskeletts sind unmittelbare Reaktion der Zelle auf veränderte Zelloberflächenbedingungen, in diesem Fall Substrat-Kontakt, was

eine transmembranöse Signalübermittlung voraussetzt. Die Adhäsion einer Zelle setzt die vorherige Anlagerung von der Zelle synthetisierter Adhäsionsfaktoren, wie Fibronectin,^{35,81} an das Substrat voraus. Bei der Substratadhäsion wird das gesamte Fibronectin, das an der suspendierten Zelle über die gesamte Zellmembran verteilt ist, an der substratzugewandten Zellmembran konzentriert. Fibronectin wird von bestimmten Rezeptoren der Plasmamembran gebunden. Die Stärke dieser Bindung kann von der Zelle reguliert werden: Heparansulfat verstärkt die Bindung, Hyaluronsäure vermindert sie und ermöglicht ein Ablösen der Zelle vom Substrat, wobei Substrat-adhärenthes Material (SAM, "footprint") zurückgelassen wird.²⁵ Mit der Ausbildung von Haftpunkten wird das zunächst zur Anlagerung der Zelle gebrauchte Fibronectin wegtransportiert, teils durch Endocytose, teils durch laterale Verschiebung in die Umgebung des Haftpunktes. An den Haftpunkten stehen die Adhäsionsrezeptoren der Zellmembran in enger Verbindung mit dem Cytoskelett; der Kontakt der Zellmembran zur extrazellulären Matrix besteht hier ohne Vermittlung von Adhäsionsfaktoren (Adhäsions-Plaques). Das Membranprotein Vinculin ist ein wesentlicher Bestandteil dieser Adhäsions-Plaques: seine Zunahme in den Haftpunkten geht mit der Abnahme von Fibronectin parallel. Es ist möglicherweise als Adhäsionsrezeptor anzusehen.⁵ Die kontakt-induzierte Ausbildung der perizellulären Matrix während der Adhäsion bestimmt die Ausrichtung des Cytoskeletts (polarized cytoskeleton), das es der Zelle ermöglicht, sich der Umgebung anzupassen. Die Cytoskelett-Organisation ihrerseits teilt sich der Umgebung über die perizelluläre Matrix mit. Mikrotubuli legen dabei die Zellpolarität fest. Lamellipodien bilden sich bei Granulocyten in den Regionen um die Mikrotubuli-Enden nach vorne aus, nach Colchicininwirkung in der gesamten Zellperipherie. Durch die Hemmung der Mikrotubulusbildung ist die Zelle wie "ein Schiff ohne Steuer". Chemotaxis setzt die Orientierungsfähigkeit der Zelle voraus. So hemmt Colchicin die

Abb. 2

Adhäsionsplaque mit Adhäsionsrezeptoren (AdRe), die möglicherweise über Vinculin (Vin) mit den einstrahlenden Mikrofilamentbündeln (Mfb) in Verbindung stehen. In der Umgebung erfolgt die Adhäsion vermittels Fibronectin (Fc); ihre Stärke kann durch Glucosaminoglykane (GAG) reguliert werden. Über Glykoproteine (Gp) in der "flüssigen" Phospholipid-Doppelschicht (Ph) der Zellmembran steht Fibronectin mit Mikrofilamenten (Mf) der DCMS in Verbindung (Fibronexus). Andere Komponenten der DCMS sind intermediäre Filamente (iF), Myosinfilamente (Myf) und Mikrotubuli (Mt).



(in Anlehnung an 23, S. 58, 25, S. 424, 50, S. 35)

Chemotaxis von neutrophilen Granulocyten in Konzentrationen, die denen für die Fixierung in der Metaphase entsprechen. Die Orientierung der Zelle ist unabhängig vom kontraktile Actomyosin-System.⁶

Die Ausbildung von Pseudopodien, die die Adhäsion ermöglichen, erfolgt durch das kontraktile System und nicht durch eine Veränderung der Oberflächenladung der Zellmembran (Kolloid-Theorie nach Rethicy, Curtis, Weiss et al.).⁷⁷ Die Ladungsverteilung auf der Zellmembran ist lediglich Ausdruck für Veränderungen der Zellmembraneigenschaften, die allerdings das Cytoskelett beeinflussen.⁴¹

Die transmembranöse Verbindung zwischen Fibronectin-Bündeln und Mikrofilamenten (Fibronexus)⁶⁷ erklärt die Verschiebung von Fibronectin während der Adhäsion in der zweischichtigen Phospholipidmembran durch das Cytoskelett in einer "capping"-Reaktion. Die Adhäsion kann durch Störungen in der Ausbildung des Cytoskeletts nach maligner Transformation der Zelle verhindert werden.⁸⁰ Eine Umordnung des Zelltyp-abhängigen Glykoprotein-Musters der Zellmembran kann nicht nur durch Fibronectin provoziert werden, sondern auch durch Pflanzenlektine, wie Concanavalin A (Con A), und andere Liganden, wie Neurotransmitter, Hormone und Immunglobuline. Immunfluoreszenz-markierte polyvalente Antikörper und Con A werden durch Rezeptorbindung diffus auf der gesamten Zellmembran von ruhenden Fibroblasten verteilt, bei amöboider Fortbewegung jedoch auf die perinukleäre Region der Zellmembran konzentriert, die der Zelle wie eine Kappe aufsitzt (capping).³² "Capping" wird nur bei Zellen beobachtet, die sich aktiv fortbewegen können. Beim "capping" nehmen die Zellen ihre Bewegungsform an, auch wenn sie in Suspension sind. Durch die Liganden wird Substratkontakt vorgetäuscht, das kontraktile Actomyosin-System wird aktiviert, die kontraktionsbedingte Umordnung des Cytoskeletts mit zentripetalem Fluß der DCMS führt zur Kappenbildung (anchorage model, Koch, 1980), die^{38a} Lokalisation der Kappe über der perinukleären Region wird wahrscheinlich durch die Mikrotubuli-Ausrichtung bestimmt. Nach PHA-Stimulation von Lymphocyten zeigen die Uropoden Vesikel, Mikrovilli und "blebs", intracellulär "Fibrillen".

Ligandenbindung an Membranrezeptoren stimuliert die assoziierten Methyltransferasen (signal cluster) zur Methylierung von benachbarten Phospholipiden, die zu einer Abnahme der Viskosität in der Rezeptorumgebung (microenvironment) mit einer erhöhten Mobilität der Rezeptorproteine in der "flüssigen" Phospholipid-Matrix führt. Die erhöhte Verschieblichkeit der Rezeptoren ermöglicht die Kupplung an Adenylcyclase auf der Cytoplasmaseite der Membran. Je nach Zelltyp sind Kopplungsfaktoren, wie Arachidonsäure und ihre Metabolite, die Prostaglandine (Lymphocyten), zwischengeschaltet, deren Aktivität wiederum vom Ca^{2+} -abhängigen Calmodulin gesteuert wird. Andere Calmodulin-abhängige Enzyme sind die Myosin Light Chain Kinase in Nichtmuskel-Zellen und Troponin in Muskelzellen.⁴⁴ Methylierung wird unter anderem bei der Chemotaxis von Makrophagen und neutrophilen Granulocyten beobachtet.³⁴

Für die amöboide Bewegung von Nichtmuskel-Zellen wurde nach der Isolierung eines ATP-sensitiven Actomyosin-ähnlichen Proteins aus Schleimpilzen (Loewy, 1952, Ts'o et al., 1956) und der Beobachtung von^{42a, 74a} Kompressions-Kontraktionen bei Amöben (Landau et al., 1954) ein kontraktiles^{39a} System verantwortlich gemacht. Treibende Kräfte dieser Bewegung sollten sein: Kontraktionen des der Zellmembran unmittelbar anliegenden Ektoplasmaschlauchs am Uroid, die die Zelle nach vorne drücken (hydraulische Druckflußtheorie) mit Solierung (Raffung) im hinteren und Gelierung (Ausdehnung) im vorderen Zellteil (Goldacre, 1961 als Weiterentwicklung^{29a} der Sol-Gel-Theorie von Pantin, 1923 und Mast, 1926),^{44a, 51a} oder Kontraktionen des Endoplasmas im Pseudopodium, die die Zelle nach vorne ziehen (Frontzonen-Kontraktionstheorie).²

D-Filamenten an der Substrat-zugekehrten Seite und an der Zellperipherie über den Haftpunkten wurde die Kontraktion zugeschrieben, dünneren Filamenten das Vorschieben der Pseudopodien von den Haftpunkten aus. Infolge Substratadhärenz sollten vorne durch Kontraktion Zugkräfte mit Zelldehnung entstehen, während ohne Substratadhärenz hinten durch Druckkräfte eine Zellraffung mit Fältelung der Zellmembran erfolgt.^{31, 38, 70}

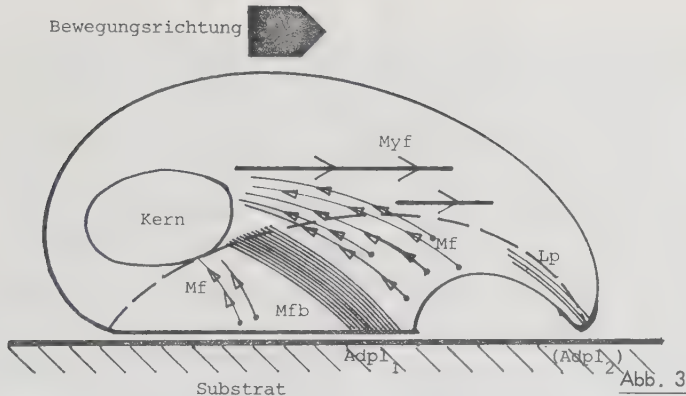
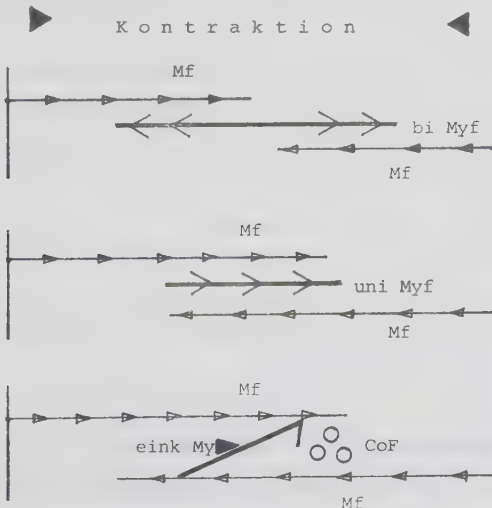


Abb. 3

Modell für die Lokomotion von NMZ: Mikrofibrillenbündel (Mfb) strahlen von der perinukleären Region in den Adhäsionsplaque ein ($Adpl_1$); durch Mikrofibrillenvernetzung wird ein Lamellipodium (LP) vorgeschoben. Mit der Ausbildung eines zweiten Adhäsionsplaque wird die Substratbindung des ersten zunehmend gelöst, die stress fibers werden aufgelöst. Durch den Gleitmechanismus zwischen Mikrofibrillen (Mf) und Myosinfilamenten (Myf) der DCMS bewegt sich die Zelle zum neuen Adhäsionsplaque hin ($Adpl_2$).

Abb. 4



(in Anlehnung an 54, S. 48)

Kontraktionsmodelle: Gleitmechanismus zwischen Mikrofibrillen (Mf) und bipolaren Myosinfilamenten (bi Myf) bzw.

unipolaren Myosinfilamenten (uni Myf) oder unipolarem Myosin, bzw.

"einköpfigem" Myosin (eink My) mit Beteiligung eines Cofaktors (CoF).

Lokomotion läßt sich als eine Aufeinanderfolge von Substrat-Adhäsionen und -Lösungen auffassen. Das Vorschieben der Filopodien beruht auf einer Actin-Polymerisation in Filamentbündeln.⁴⁰ Das Vorschieben des Lamellipodium vom Haftpunkt aus, ist durch lokale Sol-Gel-Transformation³ zu erklären, der eine kontrollierte Polymerisation und Vernetzung von Actin-Mikrofilamenten zugrunde liegt.⁴⁰ Die undulierende Membran von Monocyten läßt sich (wie bei sich ausbreitenden Megakaryocyten) als Lamellipodium in der gesamten Zell-Circumferenz verstehen. Lymphocyten haben kein Lamellipodium (und zeigen kein Ausbreiten). Die Zelle wird durch Kontraktionen infolge des Gleitmechanismus zwischen Actinfilamenten und Myosin in der DCMS vom Haftpunkt aus nach vorne gezogen. Dies ist nur möglich, nachdem ein Adhäsions-Plaque ausgebildet wurde, in dem die Actinfilamente an der Zellmembran verankert sind (analog wie in der Z-Linie des Sarkomer), und durch ihre polare Ausrichtung die Gleitrichtung des Myosinkopfes so festlegen, daß dadurch Zugkräfte auf die Zelle wirken. Substrat-Adhäsion und -Lösung wird durch die Glukosaminoglykane gesteuert:⁷ in frühen Adhäsionsphasen enthält das SAM große Mengen an Heparansulfat, in späten große Mengen an Hyaluronsäure.³⁵ Eine Regulation der Lokomotion durch membrangebundene Proteine ist über die lokale Actinpolymerisation und Filamentvernetzung, sowie über die Aktivierung der Myosin ATPase denkbar. Die Regulation ist von der Konformation von Membranglykoproteinen abhängig, die sowohl vom Cytoskelett wie auch von der perizellulären Matrix modifiziert werden kann.

Cytochalasine: Struktur und Wirkung auf Zellmorphie und kontraktiles System von Nichtmuskel-Zellen (NMZ)

Die Cytochalasine (gr. cyto-=Zell-; -Chalasin = Erschlaffung) sind Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen. Sie haben ein Makrolid-Grund-

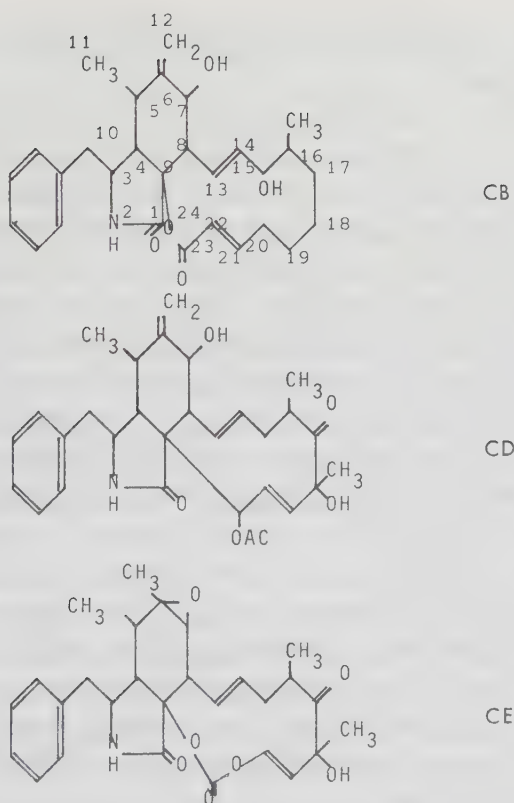


Abb. 5

Chemische Strukturformeln von Cytochalasin B (CB),
Cytochalasin D (CD) und Cytochalasin E (CE)

gerüst, vergleichbar dem der Makrolid-Antibiotika Amphotericin B und Erythromycin.

Die Cytochalasine hemmen die spontane in-vitro-Polymerisation von G-Actin nach Erhöhung der Mg^{2+} - oder der K^{+} -Konzentration der Lösung durch Bindung an das schnell wachsende gefiederte Filamentende²⁷ (wie die oben schon erwähnten intrazellulären Polymerisations-Inhibitoren). Wird Cytochalasin der Lösung im Fließgleichgewicht zugegeben, verkürzen sich die Filamente durch Depolymerisation am spitzen Ende, um sich auf die neue höhere kritische Konzentration dieses Filamentendes einzustellen. Diese Depolymerisation ist nach Entfernen von Cytochalasin aus der Lösung reversibel. Ist das spitze Ende durch Actin-Oligomer-Stabilisatoren, wie Spectrin aus Erythrocytenextrakten, ebenfalls blockiert, kommt es nicht zur Depolymerisation schon gebildeter Filamente.¹⁸

Die Polymerisationsgeschwindigkeit wird durch Cytochalasin initial erhöht: zwar stehen für die Polymerisation nur die langsam wachsenden spitzen Filamentenden zur Verfügung, jedoch wird dies zunächst durch die Bereitstellung einer größeren Zahl von Nukleationszentren mehr als ausgeglichen, da die geschwindigkeitsbestimmende Nukleationsreaktion der Polymerisation nicht erforderlich ist.^{18,20,21} Für die Reihenfolge der Wirkungsstärken der Cytochalasine ergibt sich: $CD > CE > CB$.^{19,20,27,42}

Die Cytochalasine hemmen auch die Ausbildung von Filament-Netzen (Gelierung) in vitro. Zur Ausbildung von Filament-Netzen ist möglicherweise eine bestimmte Filamentlänge Voraussetzung (Gelierungstheorie nach Flory, 1953). Jedoch können CB und CD Actin-Gele aus Fibroblasten auflösen, ohne die bereits gebildeten Filamente zu depolymerisieren.⁴⁸

Die für die Hemmung der Zellbewegung benötigten Konzentrationen an CB und CD entsprechen weitgehend denen in vitro zur Actin-Polymerisations-

hemmung benötigen. Dagegen hemmt CE die Zellbewegung schon bei erheblich niedrigeren Konzentrationen als für die Actin-Polymerisationshemmung erforderlich sind, so daß die Verhinderung der Vernetzung in vivo möglicherweise eine wichtige Rolle spielt.⁴³

An der Erythrocytenmembran konnten drei verschiedene Cytochalasin-Bindungsstellen charakterisiert werden.⁵⁶ Die Affinität an die Bindungsstellen I und III mit Hemmung des Glucose-Transports in die Zelle wird bestimmt durch die Struktur des makrocyclischen Rings. CB mit einem 14-gliedrigen makrocyclischen Ring hat zu diesen Bindungsstellen die größte Affinität, CE mit einem 13-gliedrigen und CD mit einem 11-gliedrigen makrocyclischen Ring binden hier nicht. Wird die Hydroxygruppe an C₂₀ oxydiert, nimmt die Affinität zur Bindungsstelle I ab; erfolgt eine Reduktion an C_{21/22} mit Umwandlung der Doppel- in eine Einfachbindung, geht die Affinität verloren. CD und CE binden nur an Bindungsstelle II, über die Veränderungen der Zellmorphie und -motilität bewirkt werden.⁷³ Die Affinität zur Bindungsstelle II ist für CD am größten, für CE mit einer C_{6/7}-Epoxyd-Bindung, und für CB schwächer. Bei Fibroblasten, Granulocyten und Lymphocyten hat CE jedoch eine ^{51b} größere Affinität zur Bindungsstelle II als CD (Parker et al., 1976). vgl. auch 35 b

Neben ihrer Wirkung an spezifischen Bindungsstellen zeigen Cytochalasine auch eine cytotoxische Wirkung, die je nach Zellart unterschiedliche ausgeprägt sein kann.

Die durch Stimulation ausgelöste Actin-Polymerisation in Thrombocyten wird in der Reihenfolge CE>CD>CB gehemmt. Die Cytochalasine haben keinen Einfluß auf den Actin-Polymerisationsgrad in nicht-stimulierten Thrombocyten²⁴, was durch die Blockierung des Netto-depolymerisierenden Endes in der Zelle erklärt werden kann.²⁸

CD führt bei HeLa-Zellen und bei Fibroblasten zur Ausbildung von knotigen Zellausläufern (blebs, blister), die der Zellmembran, im Gegensatz zu physiologisch auftretenden, mit einem Stiel aufsitzen. Sie sind mit Endo-

plasma gefüllt, das bisweilen auch Zellorganellen enthält, im Gegensatz zu Zellvorwölbungen während der Potocytose, die durch kortikales Ödem und hydropische Vakuolisierung charakterisiert sind. Die durch CD ausgelöste Zeiose (blebbing, blistering) ist unabhängig vom Glucose-transport in die Zelle.⁷³ Elektronenmikroskopisch zeigen sich an den Vorwölbungsstellen der "blebs" "Löcher" im kortikalen Filamentnetz, durch die Filamente bis in den Stiel "durchgebrochen" sind. Die "blebs" lassen sich als Endoplasma-"Hernien" als Folge der Erniedrigung der lokalen Endoplasma-Viskosität deuten. Sie entstehen an der gesamten Zellperipherie, lagern sich jedoch bald an dem Pol der Zelle zusammen, an dem sich der Golgi-Apparat befindet: bei HeLa-Zellen als "Krone" an der Zellspitze. An dieser Stelle erfolgt ohne Cytochalasin-Einwirkung die Ausbildung des Lamellipodium (ruffle), das von Ektoplasma aus einem Mikrofilament-Netz ausgefüllt wird. Bei Fibroblasten erfolgt im weiteren Verlauf eine Kernextrusion und eine Zell-Arborisierung.²⁹

Auch bei BSC-1 Zellen bewirkt CD das Ausbleiben der Lamellipodium-Bildung und stattdessen Zeiose, die Auflösung der Mikrofilament-Bündel (stress fibers) und Zell-Arborisierung. Während Zellextrakte unbehandelter Zellen elektronenmikroskopisch ein Cytoskelett aus einem dreidimensionalen Netz von Mikrofilament-Bündeln, intermediären Filamenten, einzelnen Mikrofilamenten und Mikrotubuli zeigen, ist dieses Netz in Zellextrakten CD-behandelter Zellen "zerrissen", die Mikrofilamente sind nach Markierung mit SI als fokale Verklumpungen sichtbar, die intakten intermediären Filamente und Mikrotubuli zeigen eine andere Verteilung und sind in ihrem Verlauf in Richtung der Filament-Foci durchgebogen. CD verhindert durch die Actin-Polymerisationshemmung die Ausbildung von Netzen durch genügend lange Mikrofilamente. Durch frustrane Kontraktion der nicht-fixierten kurzen Mikrofilamente werden sie in Foci akkumuliert; das Cytoskelett ist

"durchlöchert". Wird CD nicht den intakten Zellen sondern dem Zell-extrakt zugegeben, bleiben die Mikrofilament-Bündel erhalten, die Mikrofilamente erscheinen jedoch ebenfalls als fokale Verklumpungen, was nur zu erklären ist, wenn sie spontan "brechen", so daß das ge-fiederte Ende von CD blockiert werden kann.⁶⁰

Bei Fibroblasten und Lymphocyten induziert CB das Wandern der "blebs" zum Uropoden (im Gegensatz dazu "Krone" bei HeLa-Zellen, vgl. oben) und ein reversibles "capping" des Lektins Con A über dem Uropoden.⁷¹ Das Wandern der "blebs" zum Uropoden geht mit einer intrazellulären Actinfilament-Konzentrierung in diesem Bereich einher und mit der Ausbildung einer "Kappe" an der Membranau enseite (co-capping). Derselbe Effekt konnte mit CD an anderen Zellen erzielt werden.⁴⁹

Das Antitubulin Colchicin verhindert sowohl das "capping", wie auch das Wandern der "blebs" zum Uropoden, nicht jedoch deren Bildung.⁷¹ Die Veränderung der Mikrofilamente durch CB bewirkt eine Um-organisation des gesamten Cytoskeletts, die eine Umverteilung von Zellmembranproteinen möglich macht.

CB setzt die Steroidsyntheserate von Adrenocortikalen Tumorzellen herab. Das Cytoskelett zeigt die schon für HeLa-Zellen und Fibroblasten beschriebenen Veränderungen. ACTH steigert die Steroidsyntheserate dieser Zellen. Wurden Adrenokortikale Tumorzellen gleichzeitig CB und ACTH ausgesetzt, zeigt ein Teil der Zellen die für Cytochalasin typischen Cytoskelett-Veränderungen, der andere Teil, die für ACTH typischen. CB wirkt nicht mehr auf Zellen, die schon auf ACTH an-gesprochen haben. ACTH führt über cAMP als "second messenger" durch Ca^{2+} -Mobilisation zu einer Umordnung des Cytoskeletts mit Umver-teilung der Zellorganellen, insbesondere der Mitochondrien, durch Mikrotubuli (durch Colchicin wird die Steroidsyntheserate ebenfalls ge-senkt), und mit Transport von Makromolekülen (Cholesterin) zu den Syntheseorten durch Mikrofilamente (Zor, 1983, dynamic cytoenvironment).^{80a} Die Unterbrechung der Mikrofilamente durch Cytochalasin blockiert den Transport

von Cholesterinmolekülen zu den Steroid syntheseorten.⁴⁶ Die Hemmung des axonalen Transports durch CB³⁷ kann genauso erklärt werden, die erhöhte Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin aus Synaptosomen⁶⁵ hat möglicherweise ihre Ursache in der Begünstigung der Vesikel-Membranfusion infolge verkürzter Mikrofilamente. Eine schnelle Degranulation wird beobachtet bei eingeschränkt beweglichen Neutrophilen mit pathologisch vermindertem Actingehalt und verminderter Mikrofilament-Bildung.¹⁵ CB, CD und CE hemmen die Phagocytose der neutrophilen Granulocyten.^{35b} CB und CD führen durch Steigerung der Pinocytose und Fusion von Pinosomen zur reversiblen Ausbildung von Riesenvakuolen.^{20b} Struktur und Funktion der Lysosomen bleibt intakt, im Gegensatz zur langsameren "kleinblasigen" Vakuolisierung durch lysosomotrope Substanzen, bei der nach Schädigung der Lysosomen Pinosomen dort nicht mehr entleert und zur Plasmamembran "zurückgeschickt" werden können (recycling); sie bleiben vielmehr als Vakuole im Cytoplasma liegen. Die Vielzahl der durch Cytochalasinwirkung gebildeten Pinosomen kann nicht mehr durch die Lysosomen "geschleust" werden: trotz gleichzeitiger Steigerung der Exocytose treten nach kurzer Einwirkungszeit vermehrt Vakuolen auf, die nach langer Einwirkungszeit zu Riesenvakuolen "verschmelzen". Das Riesenvakuolen-Membrancompartment steht in einem Fließgleichgewicht mit der Plasmamembran, welches durch ständigen Fluß (shuttling) von Pinosomen zwischen Vakuolen und Plasmamembran aufrechterhalten wird. Durch Membranverlagerung in den intracellulären Raum wird die Zelloberfläche verkleinert. Durch Abrundung der Zelle ist ein Teil der Oberfläche "überflüssig" geworden. Die verkürzten Mikrofilamente der DCMS können eine kleinere Fläche besser "abdecken", so daß weniger "Löcher" entstehen.^{20a,b}

Problemstellung

Mit Hilfe des Phasenkontrastzeitrafferfilms soll die Abhängigkeit der Lokomotionsgeschwindigkeit von Leukocyten von der einwirkenden Cytochalasin D- bzw. E-Konzentration bis zu cytotoxischen Konzentrationen quantitativ dargestellt werden (Dosis-Wirkungskurve). Die auftretenden Veränderungen der Zellform sollen beschrieben werden und mit den eingangs dargestellten in-vitro und in-vivo Beobachtungen verglichen werden.

Material und Methode

Gewinnung von Leukocytenkonzentrat:

Verwendet wird Patientenblut und Eigenblut. Durch Blutbildkontrolle werden pathologische Verschiebungen ausgeschlossen; reaktive Verschiebungen werden in Kauf genommen.

In einer mit Heparin ausgespülten Einmalspritze wird venöses frisch entnommenes Blut im Verhältnis 1 : 5 mit Makrodex verdünnt, um die Erythrocytensedimentation zu beschleunigen. Nachdem sich die Erythrocyten in der um 45° geneigten Spritze am Boden abgesetzt haben, wird der Überstand abgezogen und bei 1459 G am Reagenzglasboden für 5 Minuten zentrifugiert. Der Rückstand des Zentrifugats ist das Leukocytenkonzentrat; das Serum bildet den Überstand.

Herstellung der Agar-Stammlösung:

1/4 Agartablette (= 12,5 mg) der Firma Oxoid Ltd., England, wird in 12,5 ml Nährmedium RPMI 1640 (1%) der Firma Seromed, Biochrom KG, Berlin, in einem Erlenmeyer-Kolben gelöst. Die Lösung wird im Wasserbad erhitzt bis sie homogen ist.

Herstellung der Cytochalasin-Verdünnungslösungen:

Verwendet werden die Anhydride von Cytochalasin D der Firma Serva, Feinbiochemica Heidelberg, Nr. 18017, Control: K, und von Cytochalasin E (von Rosellinia necatrix) der Firma Sigma Chemical Company, No. C - 6887, Lot 40 F - 4021.

1 mg Cytochalasin D bzw. E werden in jeweils 1 ml DMSO gelöst. In einem Meßkölbchen wird mit RPMI 1640 (1%) auf 5 ml aufgefüllt. Die Konzentrationen der so erhaltenen Ausgangslösungen sind rund $4 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Eine bestimmte Menge dieser Ausgangslösungen wird jeweils mit einer Eppendorf-Pipette einer entsprechenden Menge RPMI 1640 (1%) zugegeben. Eine bestimmte Menge dieser Verdünnungs-

lösung wird wiederum mit einer Eppendorf-Pipette RPMI 1640 (1%) zugegeben, so daß eine Verdünnungslösung noch geringerer Cytochalasin-Konzentration entsteht usw. (Herstellung der Lösungen siehe Anhang).

Herstellung der Agar-Lösungen verschiedener Cytochalasin-Konzentration:

Jeweils 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungslösung, 0,4 ml Serum aus dem Überstand des Zentrifugats und 0,5 ml der erhitzten Agar-Stammlösung werden in einem Reagenzglas zusammengegeben. Die Cytochalasin-konzentrationen dieser Agar-Lösungen betragen somit 10% der Konzentration der entsprechenden Verdünnungslösung.

Die heiße Agar-Stammlösung wird mit einer geeichten Pipette schnell in das Reagenzglas gebracht. Durch kurzes Schütteln wird gemischt. Noch vor Gelierung muß die Agar-Lösung mit einer 2 ml - Einmalspritze gleichmäßig und in möglichst dünner Schicht auf einem Objektträger aufgetragen worden sein. Der pH-Wert aller Lösungen liegt bei rund 7.

Die Standardlösungen enthalten statt des Anteils an Verdünnungslösung, denselben Anteil an Lösungsmittel. Mit ihnen werden für jeden frischen Ansatz Agar-Stammlösung ein Standard-Präparat hergestellt.

Anfertigung der Präparate: ¹⁰

Auf die Agarschicht des Objektträgers wird Leukocytenkonzentrat mit einer 2 ml - Einmalspritze mit dünner Kanüle aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Mit Hartparaffin wird das Präparat luftdicht verschlossen und so vor dem Austrocknen geschützt. Zum Temperaturangleich folgt die Inkubation bei 37°C für ca. 5 Minuten. Bei dieser Temperatur erfolgt optimales Anhaften der Zellen und Ausbreiten der Granulocyten und Monocyten. Die Agarschicht begünstigt diesen Vorgang in weit größerem Maße als die Glasoberfläche des Objektträgers. Die Menge des aufgegebenen Leukocytenkonzentrats muß so bemessen werden, daß möglichst wenig Zellschichten übereinander zu liegen kommen. Ist die Flüssigkeitsschichtdicke zu groß, werden die Agar-adhärenenten Zellen durch darüber-

liegende nur unscharf gesehen.

Nicht-adhärente Zellen schwimmen in der Flüssigkeit. Sie sind abgerundet und haben deshalb im Phasenkontrast ein breites Halo. Einzelne Zellstrukturen sind nur undeutlich erkennbar. Nur Agar-adhärente Zellen wandern. Besonders Granulocyten und Monocyten lassen nach Ausbreiten (schmales Halo) einzelne Zellstrukturen gut erkennen, die jetzt alle in einer Ebene liegen. Durch kurzen leichten Druck auf das Deckglas vor Abschluß mit Hartparaffin wird der Anheftungsvorgang beschleunigt. Durch zu starke Kompression werden die Zellen allerdings in den Agar hineingedrückt oder sogar zerstört.

Um bakterielle Verunreinigung der Präparate zu vermeiden, werden keimfreies Material und sterilisierte Glasgeräte bzw. steril verpackte Einmalutensilien verwendet. Alle Arbeiten werden in einem keimarmen separaten Raum durchgeführt. Die Objektseite der Objektträger und Deckgläser dürfen bis zum Abschluß des Präparats mit Hartparaffin nicht mit den Händen berührt werden. Sie werden mit einer sterilisierten Pinzette transportiert.

Zur Lebendbeobachtung im Phasenkontrast wird die Agar-adhärente Zellschicht fokussiert. Die Beobachtungszeit pro Präparat beträgt 30 Minuten. Es stehen 3 Mikroskope zur Verfügung, die jeweils in einem Mikroskopwärmeschrank bei 37°C stehen (Mikroskopdaten siehe Anhang Tab. 4). Zur Einstellung des Präparats kann ein Binokulartubus in den Strahlengang eingeschaltet werden.

Der kinematographischen Dokumentation dienen 16 mm Schmalfilmkameras Bolex H 16 ohne Objektiv, die erschütterungsfrei an einem Wandstativ befestigt sind. Die Belichtungszeit beträgt 1/4 Sekunde. Die Kameras sind mit einer Zeitraffer- und Trickeinrichtung der Firma Kindervater gekoppelt. Es wurde eine Bildfolge von 4 Bildern pro Minute (15 s) für Präparate mit hoher Cytochalasinkonzentration im Agar gewählt, eine Bildfolge von 6 Bildern pro Minute (10 s) für solche mit niedriger Cytochalasinkonzentration im Agar.

Laufbild- und Teilbildanalyse des Phasenkontrastzeitrafferfilms: 58

Die Laufbild- und Teilbildanalyse erfolgt mit dem HKS-Filmbetrachter der Firma Hünemörder (Vergrößerung 10 x).

Die Laufbildanalyse gibt Aufschluß über die Veränderungen der Zellmorphie in Abhängigkeit von der Zellfunktion. Durch Vergleich der Laufbildanalysen bei verschiedenen Cytochalasinkonzentrationen mit denen des Standard wird die Abhängigkeit der Zellmorphie von der Cytochalasinkonzentration im Agar erfaßt.

Durch die Teilbildanalyse kann die Auswirkung der verschiedenen Cytochalasinkonzentrationen auf die Zellgeschwindigkeit quantitativ beschrieben werden. Dazu werden die Bilder auf Papier projiziert, auf dem die Wanderungsstrecken jeder Zelle abgetragen werden. Bei jeder Richtungsänderung der Zelle muß mit dem Abtragen einer neuen Strecke vom Meßpunkt aus begonnen werden. Der Bildzähler ordnet jedem Bild seine Bildzahl zu. Dadurch wird die Berechnung der entsprechenden Zellgeschwindigkeit möglich (Berechnung der Wanderungsgeschwindigkeiten siehe Anhang).

Für die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit muß die Teilbildanalyse für eine Zelle immer in demselben Bildausschnitt erfolgen, da durch Verschiebung des Bildausschnitts eine Zellwanderung vorge täuscht wird. Der Meßpunkt an einer Zelle muß in den verschiedenen Bildern immer derselbe sein. Als Meßpunkt wurde für alle Leukocyten der führende Zellrand gewählt, da dieser während der gesamten Wanderung am deutlichsten von der Umgebung abgrenzbar ist. Die Strecken werden jeweils vom inneren Rand des Lichthofs aus gemessen. Der hintere Zellpol von Granulocyten und Lymphocyten löst sich während der Wanderung zuletzt abrupt vom Substrat und bleibt lange durch fadenförmige Cytoplasmaausziehungen mit der Unterlage verbunden, was die eindeutige Festlegung eines Meßpunktes erschwert. Lediglich bei Monocyten weisen vorderer und hinterer Zellrand gleichermaßen

undulierende Bewegungen auf, so daß sich hier beide als Meßpunkt eignen. Bei allen Leukocyten wird der Zellkern während der Fortbewegung oft sehr stark verformt, so daß der Rand des Zellkerns als Fixpunkt nicht in Frage kommt.

Ergebnisse

Die Dosis-Wirkungskurven für die Lokomotion von Leukocyten sind dargestellt in Abbildung 6 bis 8 für Cytochalasin D (CD) und in Abbildung 9 bis 11 für Cytochalasin E (CE). Die entsprechenden Zahlenwerte können Tabelle 1 für CD und Tabelle 2 für CE entnommen werden. Zum Vergleich in Tabelle 3 die mittlere Wanderungsgeschwindigkeit von Leukocyten in den Standard-Präparaten ohne Cytochalasinzusatz.

Die Konzentrationsbereiche unterschiedlicher Cytochalasinzellwirkungen wurden in den Abbildungen durch Pfeile besonders markiert. Dabei steht $H_a - H_e$ für den Konzentrationsbereich mit annähernd linear zunehmender Hemmung der Lokomotionsgeschwindigkeit (H - Bereich),

$P_a - P_e$ für den Konzentrationsbereich mit annähernd konstanter Lokomotionsgeschwindigkeit ("Plateau", P - Bereich);

M markiert den Beginn des Konzentrationsbereichs mit morphologischen Zellveränderungen (M - Bereich),

C den des Konzentrationsbereichs mit cytotoxischen Zellveränderungen (C - Bereich)

Beeinflussung der Lokomotion durch Cytochalasin D:

Bis zu einer CD-Konzentration von $10^{-8} M$ nimmt die mittlere Geschwindigkeit der neutrophilen Granulocyten geringfügig zu, um dann bis zu einer Konzentration von $3,3 \cdot 10^{-7} M$ annähernd linear abzunehmen (H - Bereich).

Die für diesen Konzentrationsbereich durch lineare Regression berechnete Geradengleichung $\bar{x} = -0,9 \cdot 10^{-8} C_{CD} + 25,45$ hat ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,9$.

Bis zu einer CD-Konzentration von rund $5 \cdot 10^{-7} M$ bleibt die

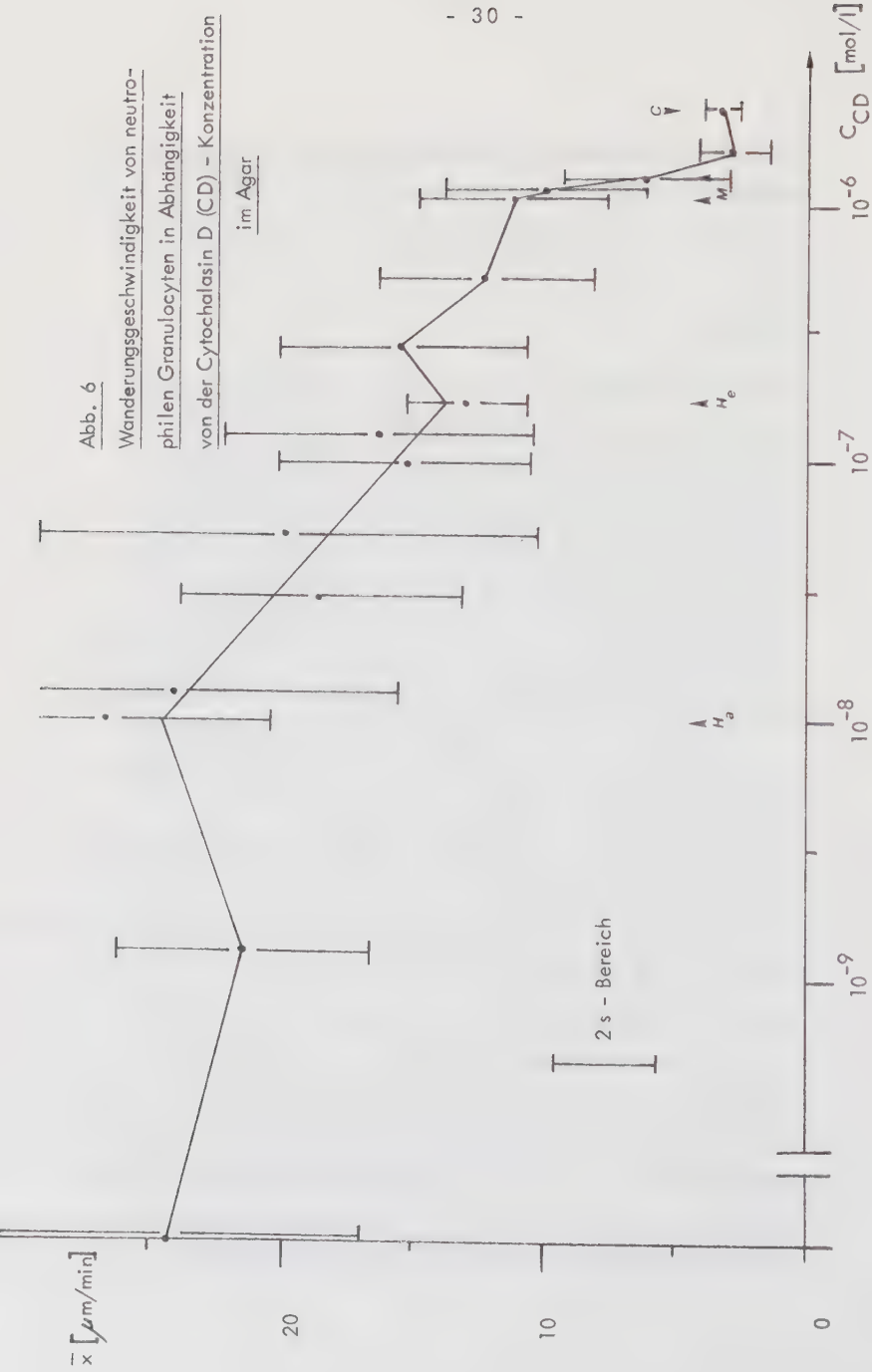


Abb. 6

Wanderungsgeschwindigkeit von neutro-
philen Granulocyten in Abhängigkeit
von der Cytochalasin D (CD) - Konzentration
im Agar

Abb. 7

Wanderungsgeschwindigkeit von eosinophilen

Granulocyten (•) und Monocyten (x) in

Abhängigkeit von der Cytochalasin D (CD) -

Konzentration im Agar

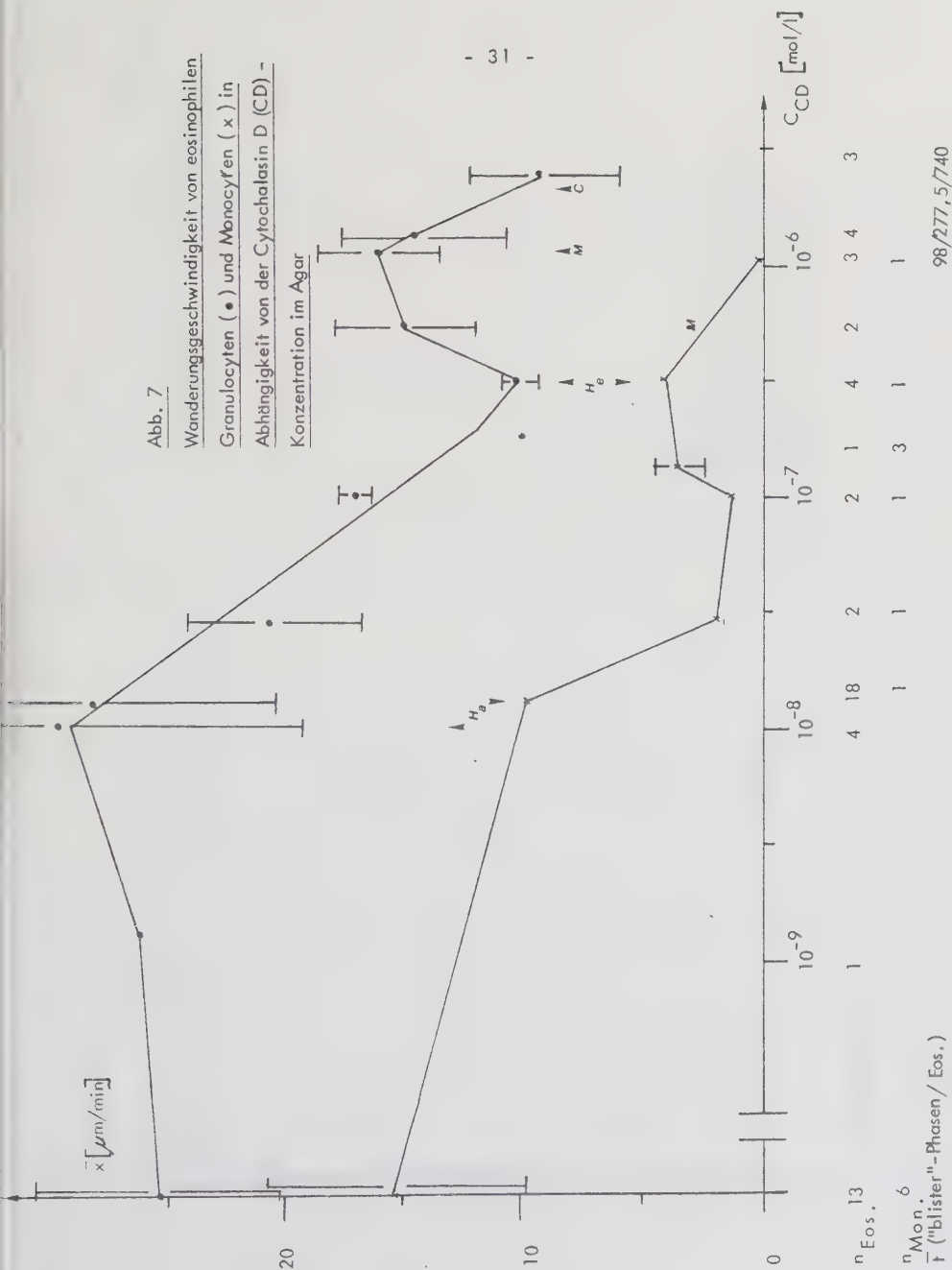
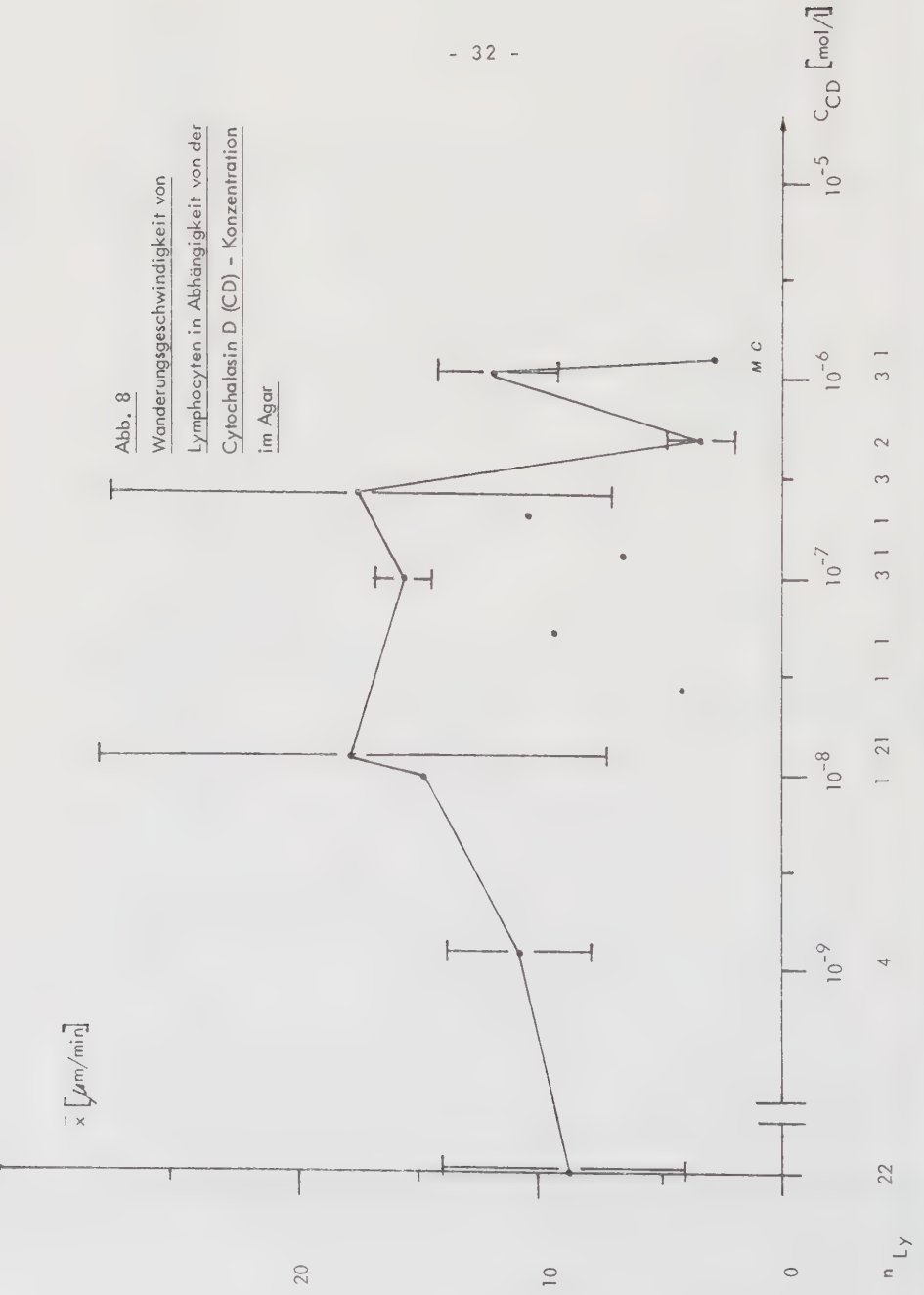


Abb. 8
Wanderungsgeschwindigkeit von
Lymphocyten in Abhängigkeit von der
Cytochalasin D (CD) - Konzentration
im Agar



C_{CD} [mol/l]	neutrophile Granulocyten			eosinophile Granulocyten			Monocyten			Lymphocyten		
	$\bar{x}$	n	s	$\bar{x}$	n	s	$\bar{x}$	n	s	$\bar{x}$	n	s
	[$\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$]		[$\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$]	[$\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$]		[$\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$]	[$\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$]		[$\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$]	[$\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$]		[$\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$]
2 $\cdot 10^{-9}$	21,58	16	4,82	26,17	1	-				10,8	4	2,93
10^{-8}	25,19	21	6,27	29,96	4	10,45				14,67	1	-
2 $\cdot 10^{-8}$	24,28	71	8,67	28,22	18	7,71	9,96	1	-	17,83	21	10,58
5 $\cdot 10^{-8}$	18,61	43	5,47	20,88	2	3,71	1,61	1	-	4,13	1	-
7,5 $\cdot 10^{-8}$	19,94	18	9,8							9,17	1	-
10^{-7}	15,4	12	4,87	17,25	2	0,35	1,04	1	-	15,44	3	1,21
2 $\cdot 10^{-7}$	16,41	34	6,02				3,36	3	1,13	6,25	1	-
3,3 $\cdot 10^{-7}$	12,89	11	2,14	10,21	1	-				9,1	1	-
5 $\cdot 10^{-7}$	15,6	14	4,72	10,34	4	0,68	3,96	1	-	17,21	3	10,32
7,5 $\cdot 10^{-7}$	12,3	16	4,21	16,17	2	3,06				3,11	2	1,26
1,4 $\cdot 10^{-6}$	11,15	33	3,73				0,27	1	-	11,67	3	2,47
1,5 $\cdot 10^{-6}$	9,92	24	4	16,37	3	2,7						
2 $\cdot 10^{-6}$	6,28	32	3,31	14,67	4	3,53						
2,8 $\cdot 10^{-6}$	2,96	8	1,37									
4 $\cdot 10^{-6}$	3,37	4	0,72	9,77	3	3,17				2,3	1	-

Wanderungsgeschwindigkeit von Leukocyten in Abhängigkeit von der Cytochalasin D - Konzentration im Agar

(Tab. 1)

mittlere Geschwindigkeit etwa konstant, nimmt eventuell sogar geringfügig zu, um dann bis zu einer Konzentration von 10^{-6} M langsam, bei höheren Konzentrationen schnell abzunehmen.

Die Konzentrations-Geschwindigkeitskurve für eosinophile Granulocyten zeigt initialen Anstieg und linearen Abfall in denselben Konzentrationsbereichen wie die für neutrophile. Die für den linearen Abfall durch lineare Regression berechnete Geradengleichung $\bar{x} = -1,51 \cdot 10^{-8} C_{CD} + 30,77$ hat ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,97$. In Anbetracht der geringen Zellzahl bei zwei Konzentrationen wurde in Kauf genommen, daß die Ausgleichsgerade in diesen Fällen knapp ausserhalb des 2 s - Bereichs verläuft. Bis zu einer CD-Konzentration von 10^{-6} M folgt ein "später" Anstieg der Kurve, bei höheren Konzentrationen ein steiler Abfall.

Die Konzentrations-Geschwindigkeitskurve für Monocyten hat keinen initialen Anstieg. Sie fällt ab einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-8}$ M steil ab und hat einen bei 10^{-7} M "späten" Anstieg bei niedrigerer Konzentration als die entsprechende Kurve für eosinophile Granulocyten.

Die Konzentrations-Geschwindigkeitskurve für Lymphocyten zeigt einen steilen initialen Anstieg bis zu einer CD-Konzentration von $2 \cdot 10^{-8}$ M. Ein H - Bereich läßt sich nicht markieren.

Bei einer CD-Konzentration von $4 \cdot 10^{-6}$ M wurden nur noch einzelne neutrophile Granulocyten mit sehr langsamer Lokomotion während der Beobachtungszeit von 30 Minuten gesehen.

Beinflussung der Lokomotion durch Cytochalasin E:

Bis zu einer CE-Konzentration von $2 \cdot 10^{-9}$ M nimmt die mittlere Geschwindigkeit für neutrophile Granulocyten deutlich zu, um dann bis $2 \cdot 10^{-8}$ M wieder auf die Ausgangsgeschwindigkeit abzufallen, die bis $1,5 \cdot 10^{-6}$ M konstant bleibt.

$\bar{x} [\mu\text{m}/\text{min}]$

40

30

20

10

0

2 s - Bereich

$\uparrow H_a$

$\uparrow H_e P_a$

$\uparrow P_e$

$\uparrow C$
 $\uparrow M$

$C_{CE} [\text{mol/l}]$

10^{-5}

10^{-6}

10^{-7}

10^{-8}

10^{-9}

$n_{Neutr.}$

$\bar{F}$ ("blister"-Phasen/Neutr.)

26

62

6

53

10/8

166, 5/525

- 35 -

Abb. 9

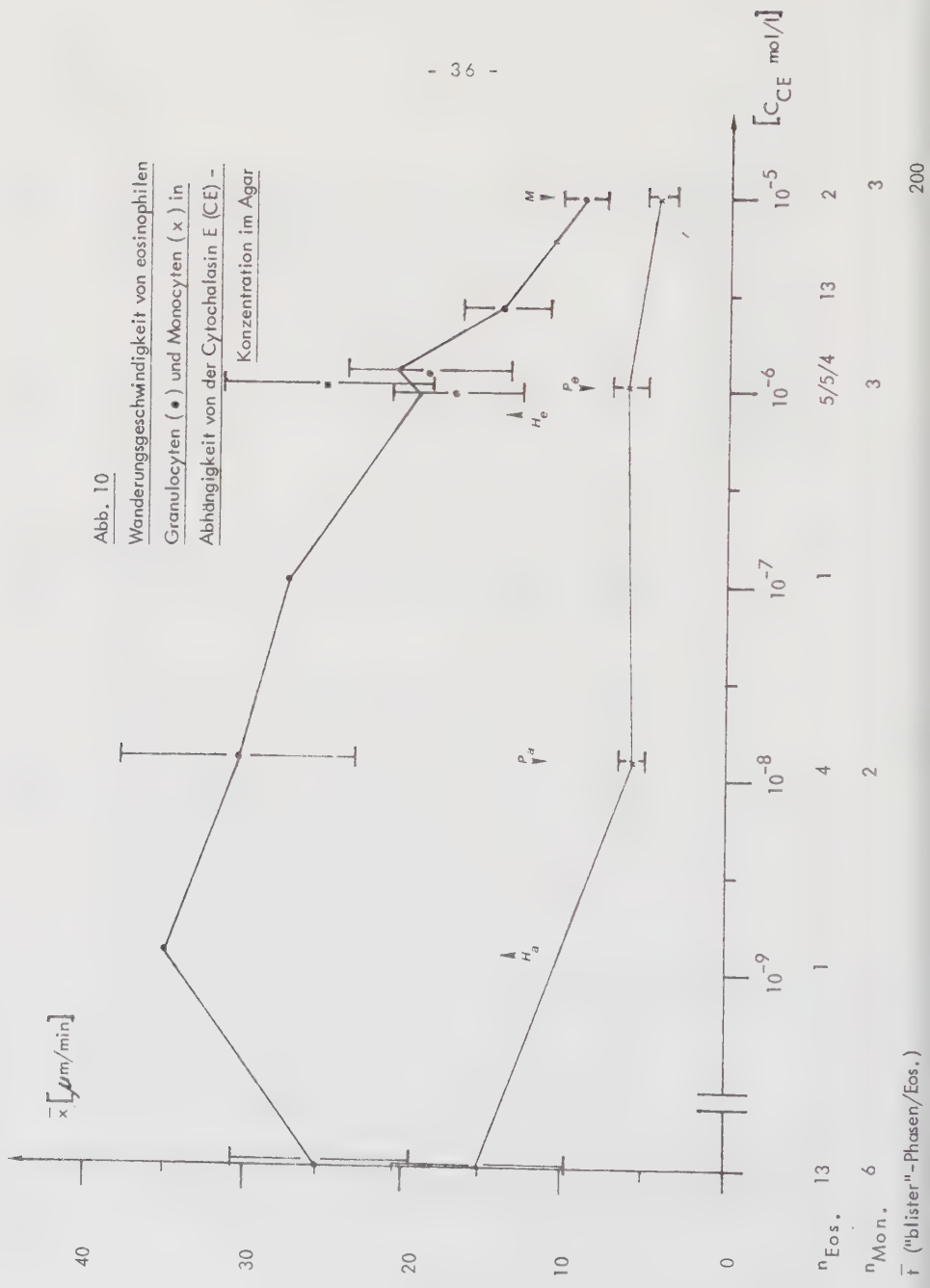
Wanderungsgeschwindigkeit von neutrophilen

Granulocyten in Abhängigkeit von der

Cytochalasin E (CE) - Konzentration im Agar

Abb. 10

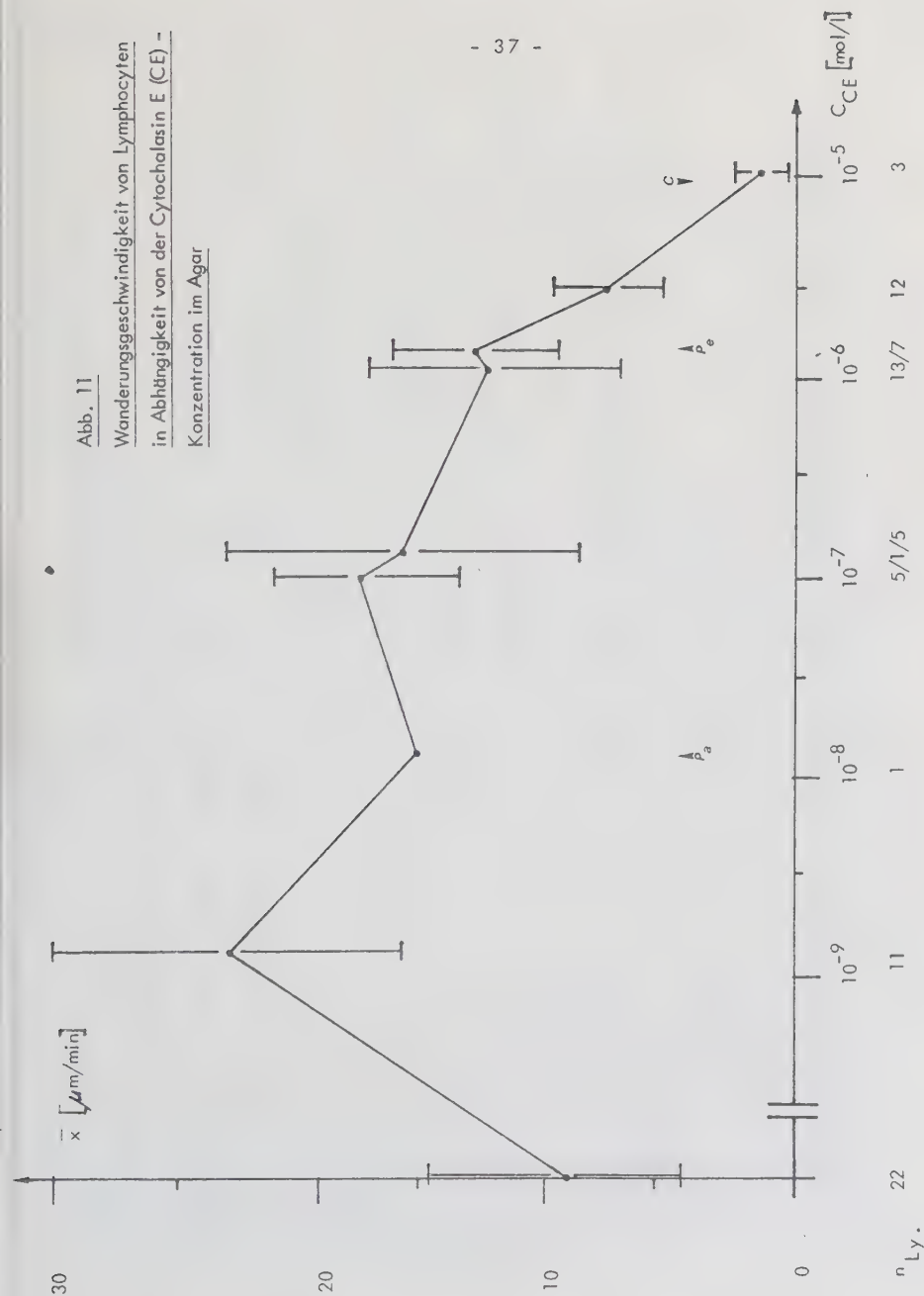
Wanderungsgeschwindigkeit von eosinophilen
Granulocyten (•) und Monocyten (x) in
Abhängigkeit von der Cytochalasin E (CE) -
Konzentration im Agar



$\bar{t}$ ("blister"-Phasen/Eos.)

Abb. 11

Wanderungsgeschwindigkeit von Lymphocyten
in Abhängigkeit von der Cytochalsin E (CE) -
Konzentration im Agar



Wanderungsgeschwindigkeit von Leukocyten in Abhängigkeit von der Cytochallasin E - Konzentration im Agar
(Tab. 2)

C _{CCE} [mol/l]	neutrophile Granulocyten			eosinophile Granulocyten			Monocyten		
	$\bar{x}$	$\mu\text{m. min}^{-1}$	$\frac{n}{s}$	$\bar{x}$	$\mu\text{m. min}^{-1}$	$\frac{n}{s}$	$\bar{x}$	$\mu\text{m. min}^{-1}$	$\frac{n}{s}$
$2 \cdot 10^{-9}$	35,09	26	9,22	35,25	1	-			
$2 \cdot 10^{-8}$	22,76	62	8,13	30,35	4	5,96	5,66	2	0,83
10^{-7}	22,57	6	10,68						
$1,5 \cdot 10^{-7}$	26,37	37	6,6	36	1	-			
$2 \cdot 10^{-7}$	22,88	49	6,6						
10^{-6}	18,31	9	3,97	16,8	5	4,42			
$1,5 \cdot 10^{-6}$	21,81	54	5,03	24,89	5	6,91	5,81	3	0,96
$2 \cdot 10^{-6}$	13,28	62	4,61	18,06	4	5,19			
$5 \cdot 10^{-6}$	13,71	53	4,34	13,55	13	2,91			
10^{-5}	9,44	10	3	8,46	2	0,76			
$1,33 \cdot 10^{-5}$	5,53	8	3,65				4,19	3	0,85

Wanderungsgeschwindigkeit von Leukocyten in den

Standard-Präparaten

(Tab. 3)

Fortsetzung von (Tab. 2)

Lymphocyten			
C_{CE}	$\bar{x}$ [$\mu m \cdot min^{-1}$]	n	s [$\mu m \cdot min^{-1}$]
$2 \cdot 10^{-9}$	23,02	11	7,31
$2 \cdot 10^{-8}$	15,34	1	-
10^{-7}	17,84	5	4,25
$1,5 \cdot 10^{-7}$	30	1	-
$2 \cdot 10^{-7}$	16,01	5	7,49
$1,5 \cdot 10^{-6}$	12,39	13	4,8
$2 \cdot 10^{-6}$	13,02	7	3,72
$5 \cdot 10^{-6}$	7,45	12	2,32
$1,33 \cdot 10^{-5}$	1,2	3	0,92

$\bar{x}$ [$\mu m \cdot min^{-1}$]	n	s [$\mu m \cdot min^{-1}$]
24,36	184	7,55
25,23	13	5,64
15,4	6	5,54
8,99	22	5,3

neutrophile

Granulocyten

eosinophile

Granulocyten

Monocyten

Lymphocyten

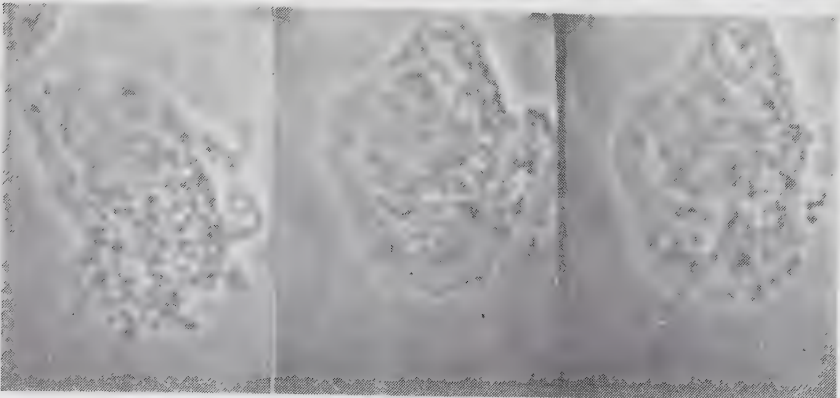
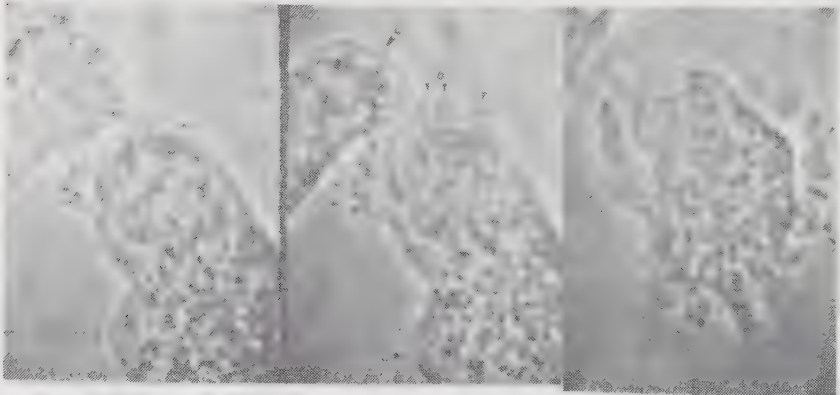
Im Konzentrationsbereich von $1,5 \cdot 10^{-6}$ M bis 10^{-5} M nimmt die Geschwindigkeit langsam ab, darüber hinaus schnell.

Die Konzentrations-Geschwindigkeitskurve für eosinophile Granulocyten zeigt einen initialen Anstieg bis $2 \cdot 10^{-9}$ M, jedoch kein Plateau, die für Monocyten keinen initialen Anstieg, jedoch im Konzentrationsbereich von $2 \cdot 10^{-8}$ M bis $1,5 \cdot 10^{-6}$ M ein Plateau.

a

b

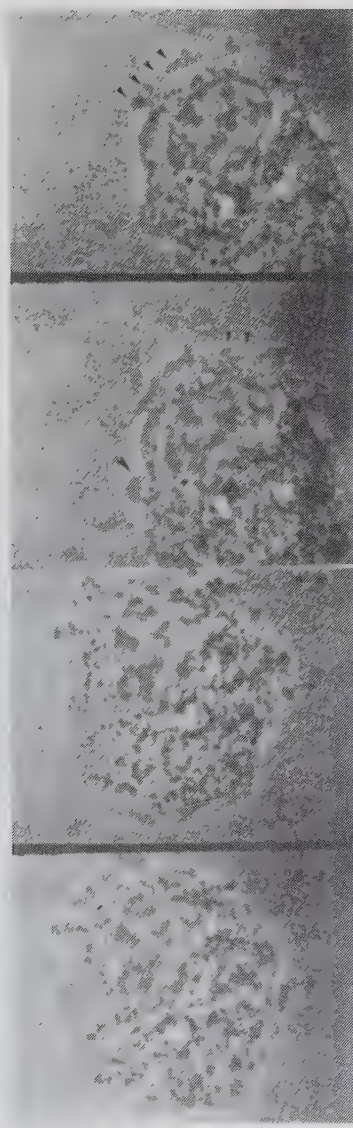
c



d

e

f



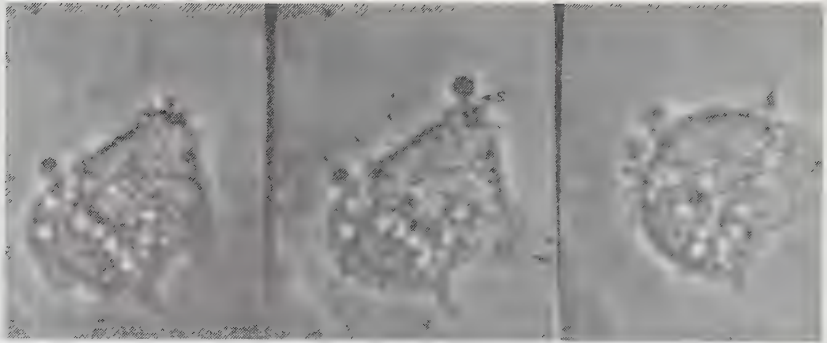
g h i

Abb. 12, a - i

Ein wandernder neutrophiler Granulocyt (Typ II nach Rind) mit "blisters" nur am Uropoden. In c retrahiert sich die Zelle (Abrundung) und bildet "blisters" in der gesamten Zellcircumferenz aus. Der zwischenzeitliche (L in b = Lamellip.) Versuch ein Lamellipodium (L) auszubilden (in e) scheint fehlzuschlagen; in die Cytoplasma-Ausstülpung dringend sofort Granula ein. Bei Wiederaufnahme der Wanderung in i sind wiederum nur wenige kleine "blisters" am Uropoden zu sehen (in i und j). In a - d links oben ein zweiter wandernder neutrophiler Granulocyt.

3471 gelb, CD $1,5 \cdot 10^{-6}$ M $\overline{\text{I}}$ 2 cm = $10 \mu\text{m}$ (Vergrößerung 2000 x), Beobachtungszeit 4 Min.

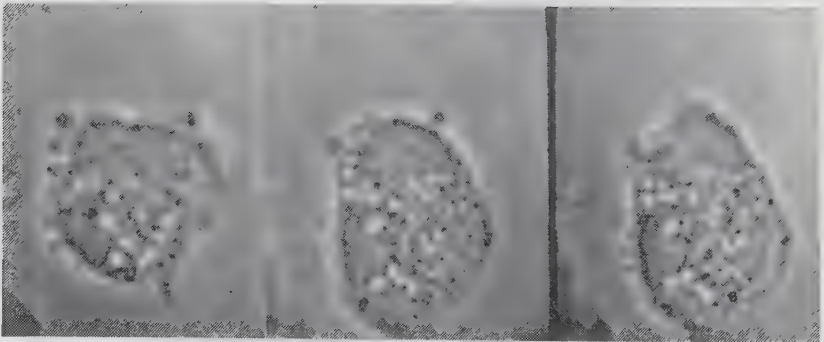
(3471 = Filmmummer, gelb = Mikroskopennung)



a

b

c



d

e

f

Abb. 13, a - f

Ein bislang wandernder neutrophiler Granulocyt (Typ II nach Rind) retrahiert sich. In a und b sind deutlich Retraktionsfäden (R) erkennbar. Einzelne "blister" (b) sitzen der Zellmembran mit einem Stiel (S) auf. Der Versuch, ein Lamellipodium auszubilden (L) scheint zu mißlingen (in b und c). Wegen der großen Zahl von Vakuolen (V) im Cytoplasma handelt es sich wohl um einen Phagocytin, oder um eine verstärkte Pinocytose. 3471 gelb, $CD\ 1,5 \cdot 10^{-6}\ M$, Beobachtungszeit 3 Min.

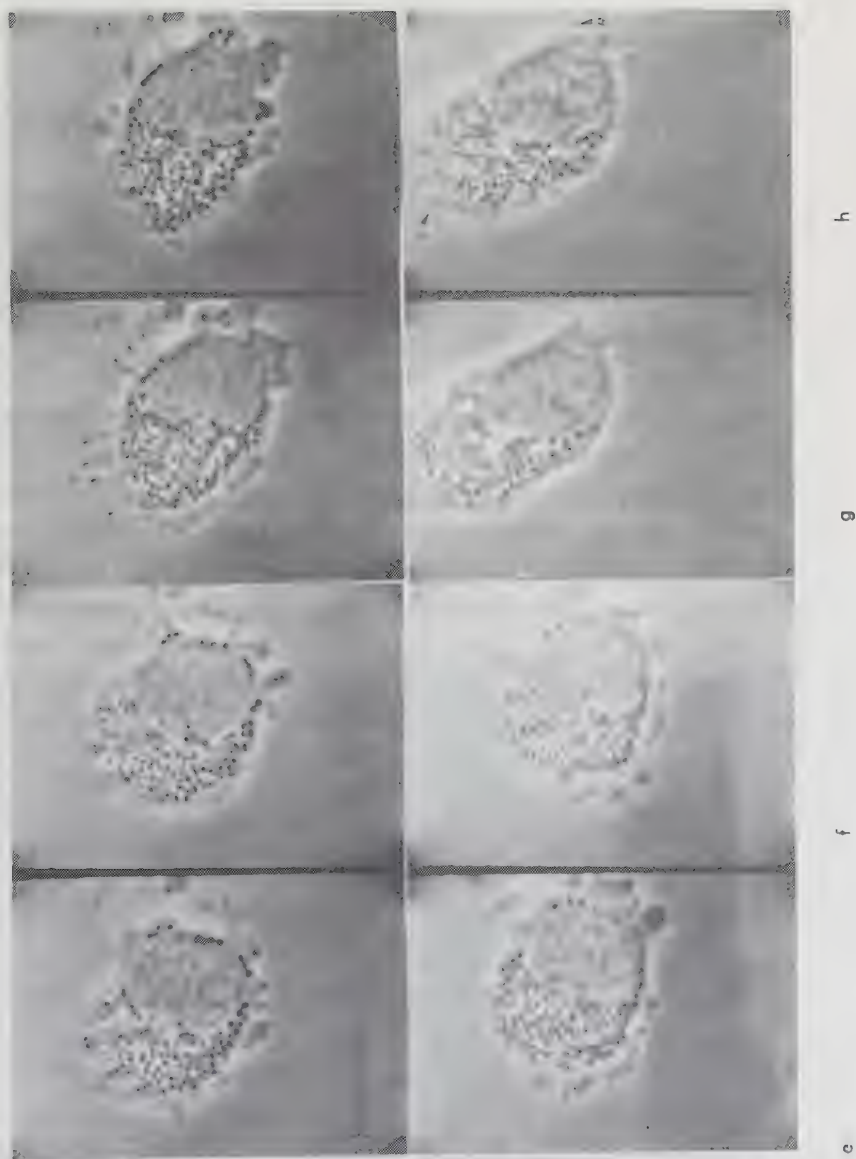


Abb. 14, Legende siehe Seite 45, oben

Die Konzentrations-Geschwindigkeitskurve für Lymphocyten zeigt einen steilen initialen Anstieg bis zu einer CE-Konzentration von $2 \cdot 10^{-9} \text{ M}$, einen Abfall bis $2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ auf das "Plateau", das jedoch auf höherem Geschwindigkeitsniveau liegt als die Ausgangsgeschwindigkeit. Dem "Plateau" folgt ab einer CE-Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ein steiler Abfall. Der Geschwindigkeitsmeßwert eines Lymphocyten bei $1,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ wurde als "Ausreißer" gewertet und nicht in den Kurvenverlauf miteinbezogen.

Veränderungen der Zellmorphie:

Erste Veränderungen der Zellmorphie zeigen sich bei CD-Konzentrationen, die zu dem "späten" steilen Abfall der Konzentrations-Geschwindigkeitskurve führen (M - Bereich). Bei einer CD-Konzentration von $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ werden die Wanderphasen der meisten neutrophilen Granulocyten von "blister"-Phasen unterbrochen, die im Mittel 101,51 s (1,69 Min.) lang dauern. "Blister"-Phasen eosinophiler Granulocyten dauern bei einer Konzentration von CD $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ im Mittel 98 s (1,63 Min.) (s. Anhang und Tabelle 4) Während der "blister"-Phasen ist die Zelle abgerundet, sie hat sich vom Substrat retrahiert (breiterer Lichthof). Granulocyten blistern an der gesamten Zellcircumferenz. Ständig werden neue "blister" vorgestülpt und wieder eingezogen; manche sitzen der Zellmembran mit einem Stiel auf und enthalten Granula. (Abb. 13) Mehrfach hintereinander werden Lamellipodien an unterschiedlichen Stellen ausgebildet, in die jedoch schon während der Bildung Granula eindringen. Sie werden gleichsam in "blister" umgewandelt. Während der "blister"-Phase ist keine nennenswerte Lokomotion zu beobachten. Mitunter werden auch gleichzeitig Lamellipodien an verschiedenen Stellen ausgebildet, so, als sei die Zelle unschlüssig über die einzuschlagende Richtung. Zu Beginn der Wanderphase verschwinden die "blister" oder sie werden am hinteren Zellpol konzentriert; allenfalls einzelne "blister" sind noch an den "Seiten" zu sehen. (Abb. 12 - 14) Vakuolen sind in den meisten Zellen zu sehen. Im CD-Konzentrationsbereich von $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ bis $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ sind die "blister"-Phasen der Granulocyten länger: sie dauern bei CD $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ für neutrophile Granulocyten im Mittel 255,71 s (4,26 Min.), für eosinophile Granulocyten

← Abb. 14, a - h

Ein eosinophiler Granulocyt unterbricht seine Wanderung, retrahiert sich (Abrundung) und "blistert". Bei Wiederaufnahme der Wanderung in g sind keine "blisters" mehr zu erkennen.

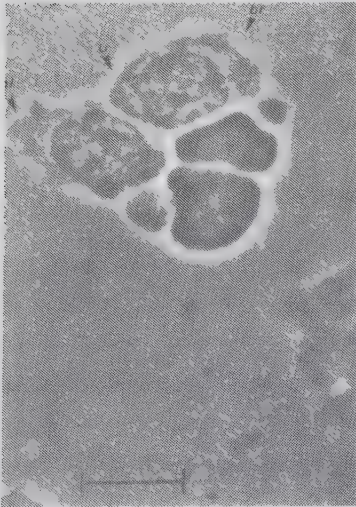
3471 gelb, $CD\ 1,5 \cdot 10^{-6} M$, Beobachtungszeit 3 Min.

Abb. 15, a - d

Oben 2 Lymphocyten neben 2 Erythrocyten. Beide Lymphocyten scheinen in ihrer Bewegungsform "gelähmt" mit "bulging bleb" (bl) und Uropoden-ähnlicher Cytoplasmavorstülpung (U); der obere Lymphocyt rundet sich in c ab und geht in Typ I nach Rind über.

Unten ein wandernder neutrophiler Granulocyt (Stabkerniger). Der Zellkern (K) ist nur sehr undeutlich erkennbar (Pfeile markieren in d die Kerngrenze); L = Lamellipodium

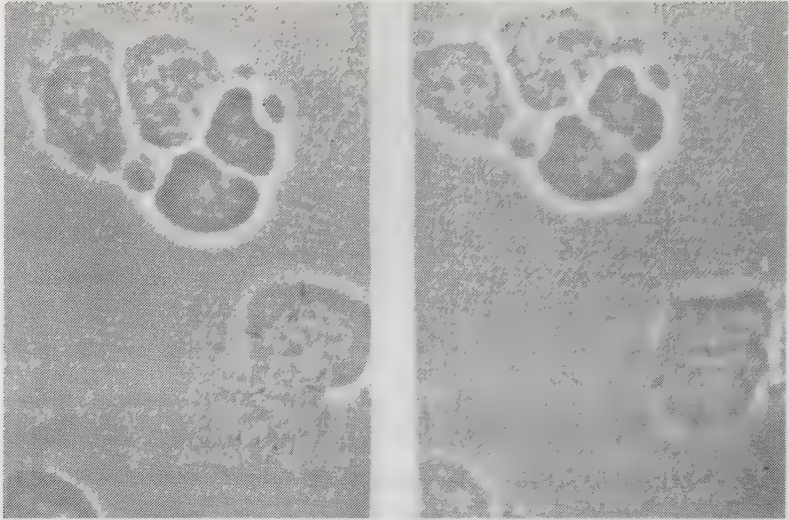
3468 rot, $CD\ 1,5 \cdot 10^{-6} M$, Beobachtungszeit 2 Min.



a



b



c

d

277,5 s (4,63 Min.), bei $CD\ 4 \cdot 10^{-6} M$ für neutrophile Granulocyten
627,14 s (10,45 Min.), für eosinophile Granulocyten 740 s (12,33 Min.).
Das Lamellipodium nimmt oft nicht mehr die gesamte Zellvorderseite ein
und weist Verformungen auf, die Granula enthalten. (Abb. 18 - 24)
Es wurden 3 eosinophile Granulocyten beobachtet, die intermittierend ihr
Cytoplasma tief einschnüren. In beiden Cytoplasma-Anteilen sind auch
Teile des Zellkerns zu finden. Durch die tiefe Einschnürung bekommen die
Zellen "Sanduhrform" ¹³. Es kommt jedoch nicht zur Kernextrusion oder
zur Abtrennung von Cytoplasma. (Abb. 19)

Lymphocyten "blister" nicht. Bei einer CD-Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-6} M$
finden sich Lymphocyten, die im Aussehen Typ II oder III nach Rind entsprechen,
jedoch nur geringe Oberflächenbewegung und keine Lokomotion zeigen. Sie
haben eine Cytoplasmavorstülpung, die einem Uropoden gleicht, und ab gegen-
überliegenden Zellpol ein "bulging bleb". (Abb. 15 - 17)

Bei einer CD-Konzentration von $10^{-5} M$ liegen alle Leukocyten wie gelähmt.
Sie haben sich retrahiert (breites Halo, undeutliche Zellstrukturen) und zeigen
meist nur noch Granulabewegung. Vereinzelt auftretend Cytoplasma-Schläuche.

An vielen Zellen sind Zeichen der Degeneration zu erkennen.

Die Zahl der Zelluntergänge nimmt während der Beobachtungszeit zu (C - Bereich). (Abb. 25 - 28)

Bei einer CD-Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ M zeigen alle noch intakten Zellen Degenerationszeichen. Die meisten Zellen sind bereits "tot". (Einschnürungen, Vakuolen, Pyknocytosis m. Perlenk.) (Abb. 29, 30)

Auch unter CE-Einwirkung sind Veränderungen der Zellform erst in dem Konzentrationsbereich zu beobachten, in dem der "späte" steile Abfall der Konzentrations-Geschwindigkeitskurve erfolgt.

Bei einer CE-Konzentration von 10^{-5} M werden erstmals Granulocyten mit den beschriebenen "blister"-Phasen beobachtet (M - Bereich).

Auch hier sitzen die "blister" der Zellmembran teilweise mit einem Stiel auf; sie enthalten bisweilen Granula. Mitunter sind Zelleinschnürungen zu beobachten.

Die zu Beginn der kurzen Wanderphasen ausgebildeten Lamellipodien sind oft verkümmert und wirken wie zerfetzt. Hin und wieder brechen Granula in sie ein. (Abb. 31, 32) Die mittlere Dauer der "blister"-Phasen nimmt für Neutrophile von 166,5 s (2,78 Min.) bei CE 10^{-5} M auf 525 s (8,75 Min.) bei CE $1,33 \cdot 10^{-5}$ M zu. Für Eosinophile konnten nur "blister"-Phasen von intakten Zellen von 200 s (3,33 Min.) Dauer bei CE 10^{-5} M gemessen werden.

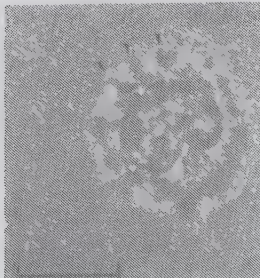
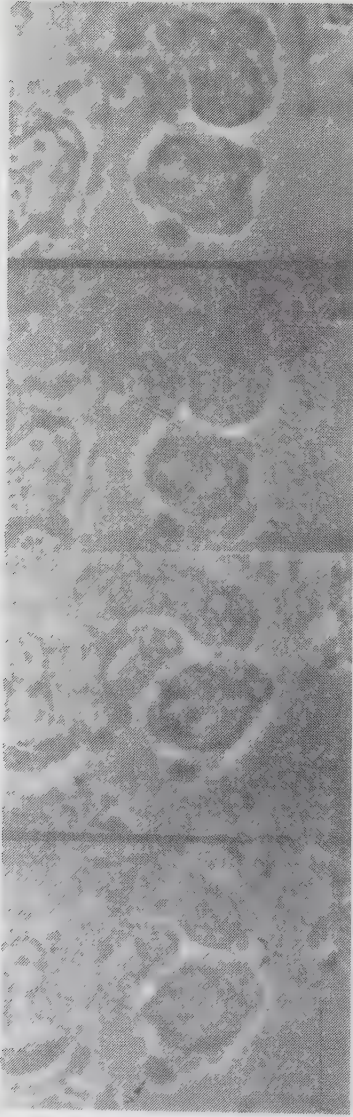


Abb. 16

Cytolyse eines Lymphocyten. Die Zellgrenze ist unscharf; die Zelle "zerfließt". Zerstörte Zellmembran → 3468 rot, CD $1,5 \cdot 10^{-6}$ M



a

b

c

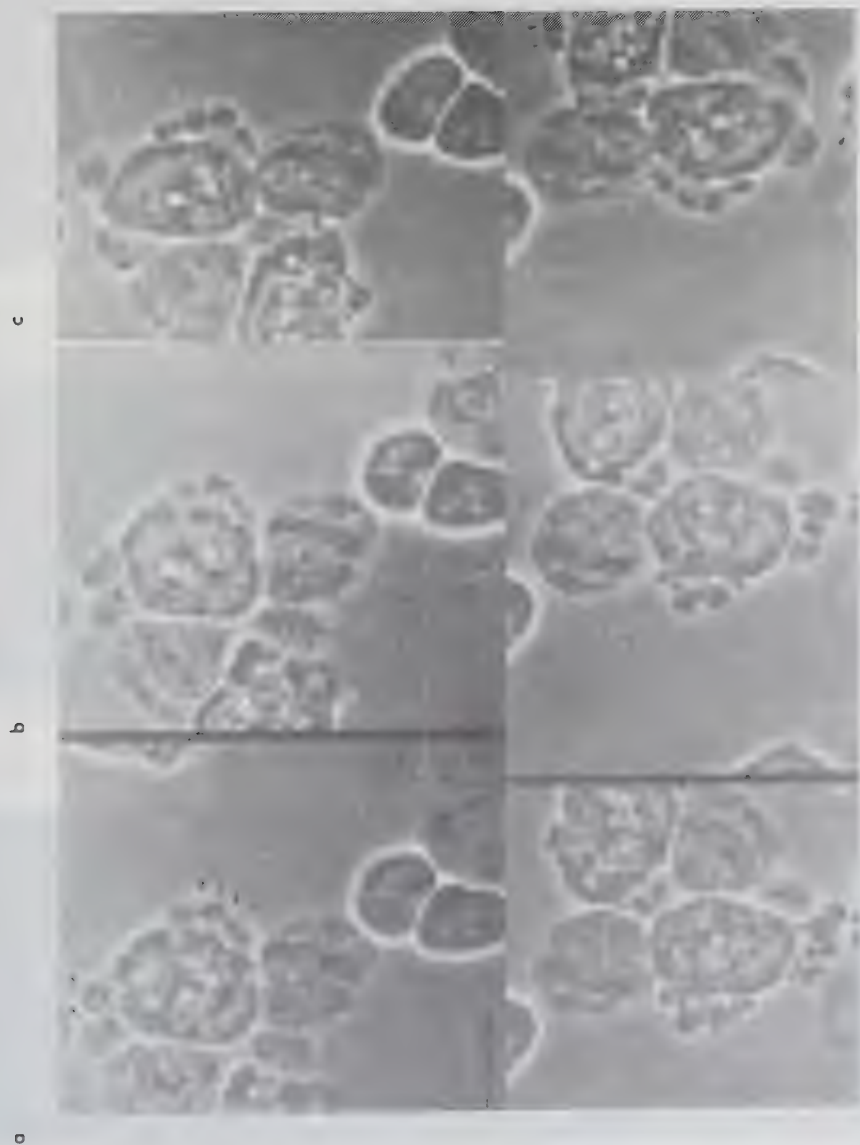
d

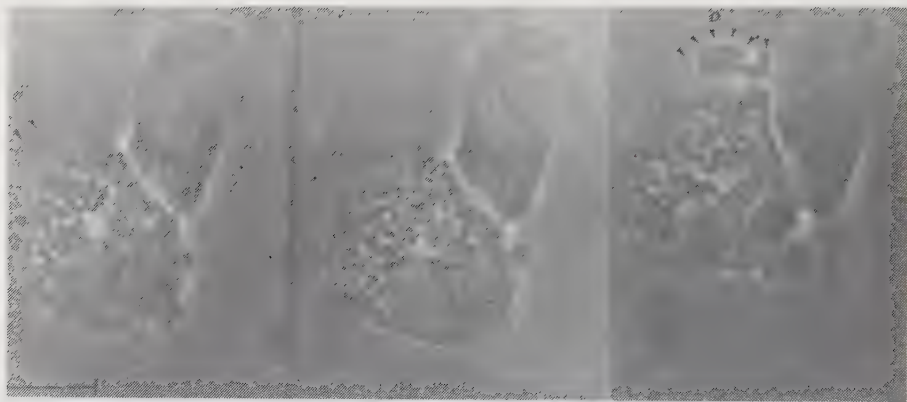
Abb. 17, a - d

In der Mitte 2 Lymphocyten, links mit blisterartigen Cytoplasmavorstülpung (V), die an einen Uropoden erinnert, und "bulging bleb" (bl) am gegenüberliegenden Zellpol, das jedoch in c seine Lage wechselt. Die Zelle rundet sich ab. Auch der Lymphocyt rechts, zunächst mit "bulging bleb", beginnt sich abzurunden. 3471 gelb, CD $1,5 \cdot 10^{-6}$ M Beobachtungszeitraum 30 Minuten

Abb. 18, a - f

3 "blisternde" neutrophile Granulocyten, 1 Lymphocyt, Typ II nach Rind (L_{II}), 1 "geldhnter" Lymphocyt (L_g). Rechts unten 2 Erythrocyten. "blister" = ► 3460 rot, CD $2 \cdot 10^{-6}$ M, Beobachtungszeit 15 Min.

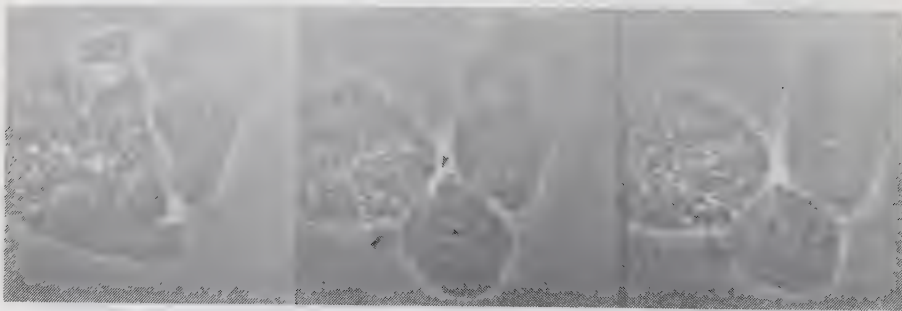




I

II

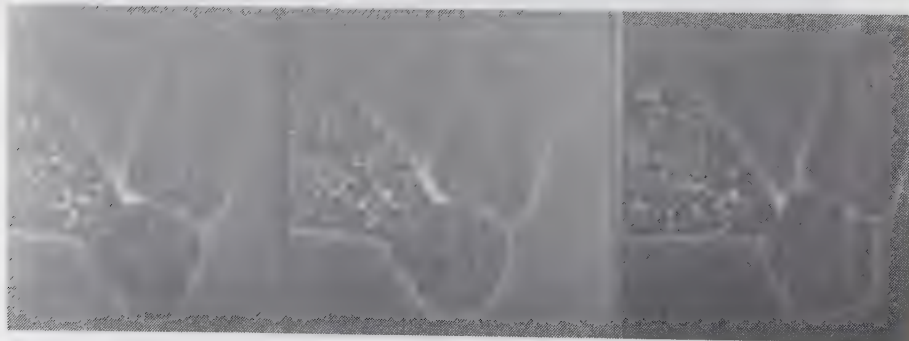
III



IV

V

VI



VII

VIII

IX



X

XI

XII



XIII

XIV

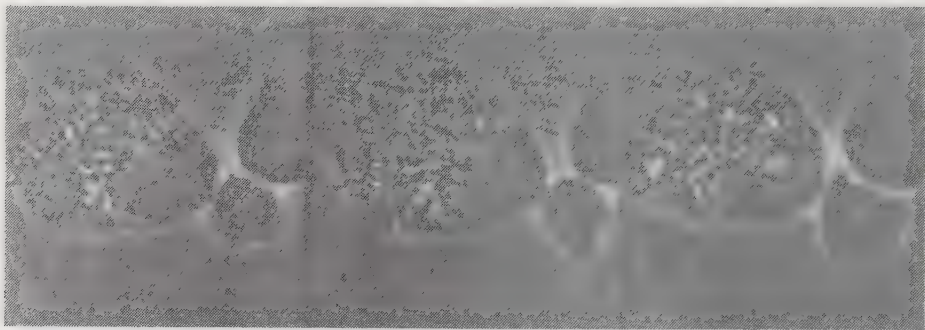
XV



XVI

XVII

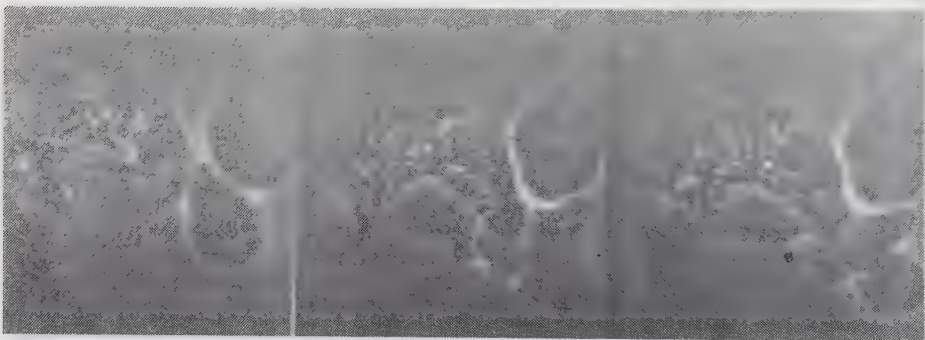
XVIII



XIX

XX

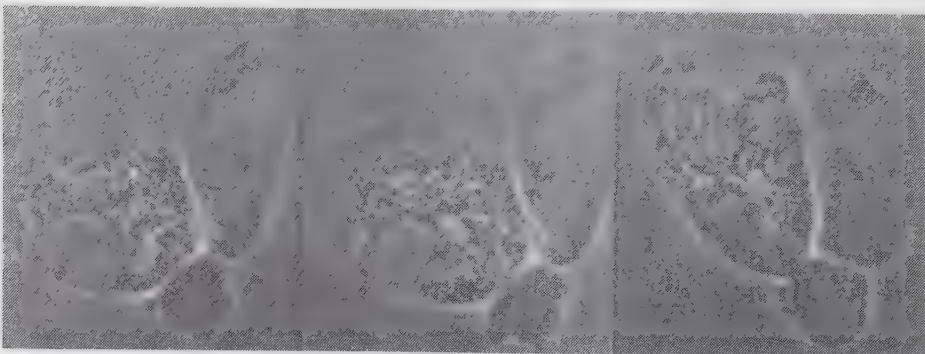
XXI



XXII

XXIII

XXIV



XXV

XXVI

XXVII

◄ Abb. 19, I - XXVII (I - V)

Nach einer Lymphocyt-Peripoleis schnürt ein bislang wandernder eosinophiler Granulocyt (L = Lamellipodium) sein Cytoplasma ein; er nimmt "Sanduhrform" an. In beiden Cytoplasma-Anteilen befinden sich Teile des Zellkerns (K). Eine Kernextrusion erfolgt jedoch nicht, auch keine Cytoplasma-Abtrennung. Während des gesamten Einschnürungsvorgangs besteht Kontakt zwischen Lymphocyt und eosinophilem Granulocyt. In III, IV Verformung des Lamellipodium (D), die Granula enthält. Einschnürung in V ►

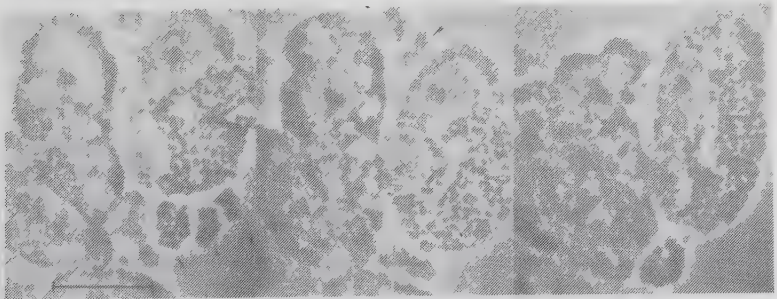
3473 grün, CD 2 . 10^{-6} M, Beobachtungszeit 12 Min.

Abb. 20, a - c

Ein neutrophiler Granulocyt (links) und ein eosinophiler Granulocyt (rechts) "blistern". "Riesenblister" des eosinophilen Granulocyten in a und c.

In den "blister" sind Granula.

3450 gelb, CD 2,8 . 10^{-6} M, Beobachtungszeit 6 Min.



a

b

c

Abb. 21, a - c ►

Ein retrahierter neutrophiler Granulocyt bildet an der gesamten Zellcircumferenz "blister" aus.

3450 gelb, CD 2,8 . 10^{-6} M, Beobachtungszeit 1 Min.



a

b

c

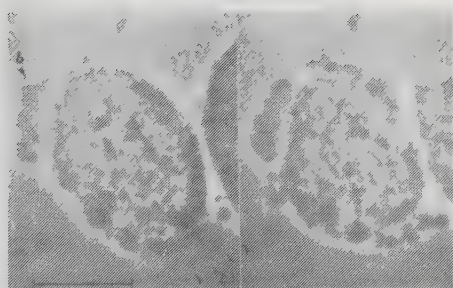
Bei einer CE-Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ M haben sich die meisten Zellen vom Agar retrahiert und liegen wie "gelähmt".

Einzelne Zelluntergänge sind zu beobachten (C - Bereich).

Einige Lymphocyten haben Uropoden-ähnliche Cytoplasmavorstülpungen und am gegenüberliegenden Zellpol ein "bulging bleb". (Abb. 33 - 36)

Monocyten sind bisweilen von einer "zerfetzten" Membran umgeben, die rege Bewegung zeigt. (Abb. 33)

Bei einer CE-Konzentration von $4 \cdot 10^{-5}$ M beherrschen degenerierte und "tote" Zellen das Bild. Noch intakte Zellen zeigen rege Granulabewegung. (Abb. 37 - 39)



a

b

Abb. 22, a, b

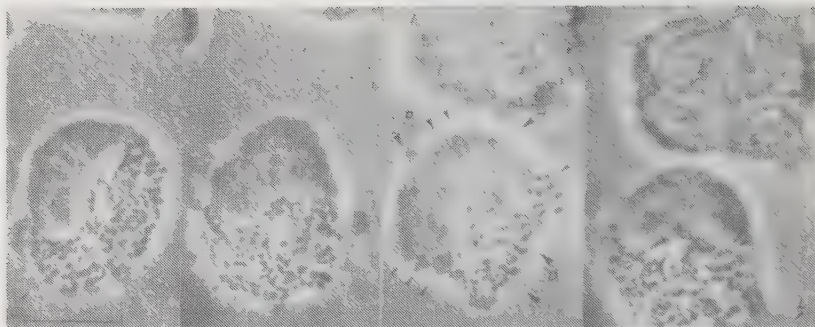
Ein bislang wandernder neutrophiler Granulocyt mit "blister" am hinteren Zellpol retrahiert sich: die Zelle rundet sich ab, die Zellstrukturen werden unschärfer. Anstelle des Lamellipodium(L) treten "blister" (b). Auch an anderen Stellen treten nun "blister" auf.
3447 gelb, CD 4 . $10^{-6}M$

Zeitdauer der "blister"-Phasen von Granulocyten: (Tab. 4)

neutrophile Granulocyten				eosinophile Granulocyten		
Cytoch. konz. [M]	Anzahl "blister"Ph	mittlere Dauer $\bar{t}$ [s]	s [s]	Anzahl "blister"Ph	mittlere Dauer $\bar{t}$ [s]	s [s]
CD 1,4. 10^{-6}	43	101,51	34,3			
CD 1,5. 10^{-6}				10	98	15,49
CD 2. 10^{-6}	21	255,71	58,1	4	277,5	82,61
CD 4. 10^{-6}	7	627,14	98,95	1	740	
CE 10^{-5}	10	166,5	46,61	3	200	37,75
CE 1,33. 10^{-5}	7	525	76,97			

Zusammenfassung der morphologischen Zellveränderungen:

Cytoc. konz. [M]	Granulocyten		Lymphocyten	Monocyten
	neutrophile	eosinophile		
CD 1,4.10 ⁻⁶ 1,5.10 ⁻⁶	"blister"-Phasen mit Zellabrundung und "blister" in gesamter Zellcircumferenz mit mittlerer Dauer von: 101,51 s Wanderphasen mit "blister" nur am hinteren Zellpol Abb. 12 Hemmung der Lamellipodienbildung, Abb. 12, 13 vermehrt Vakuolen im Cytoplasma, Abb. 13		Uropodenartige Cytoplasmavorstülpungen Abb. 15, 17 vereinzelt Cytolyse Abb. 16	
2.10 ⁻⁶	längere "blister"-Phasen: 255,71 s Abb. 18 Abb. 21 deformierte Lamellipodien Abb. 22	277,5 s "Riesenblister", Abb. 20 häufig Zelleinschnürung Abb. 19 Abb. 24		Cytolyse, Abb. 28
2,8.10 ⁻⁶ 4.10 ⁻⁶ 10 ⁻⁵	zunehmend gelähmte Zellen Zeichen der Zelldegeneration: (Einschnürungen, Vakuolen, Potocytosis mit "Schläuchen" und "Perlenketten", Granula mit Brown'scher Molekularbeweg.) Abb. 25, 26, 27, 28			
2.10 ⁻⁵	überwiegend Zelldegeneration und Zelltod (Cytolyse, Karyorhexis) Abb. 29, 30	Zelleinschnürungen, Abb. 29		
CE 10	"blister"-Phasen: 166,5 s vermehrt Vakuolen, Abb. 32	200 s tiefe Einschnürung, Abb. 31	keine Beeinträchtigung Abb. 32	
2.10 ⁻⁵ 4.10 ⁻⁵	Zellabrundung, Zellähmung, Abb. 33 Degeneration, Abb. 38, 39	Abb. 33 Abb. 37	Cytoplasmavorstülpung Abb. 34, 35, 36, 37, 38	fetzenartige Membran, Abb. 33 Cytolyse, Abb. 34, 39



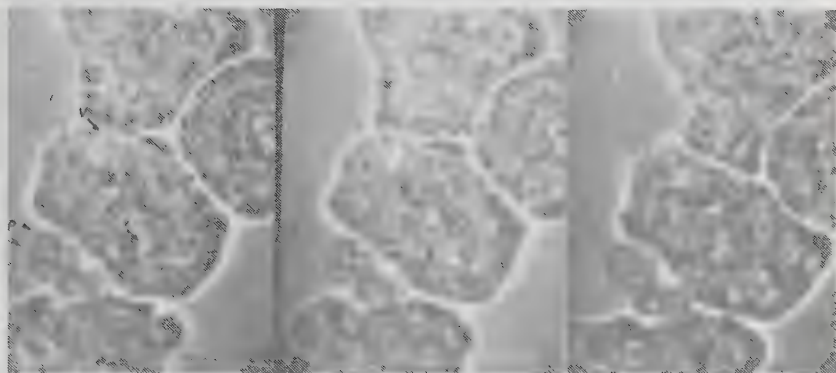
a b c d

Abb. 24, a - d

Ein wandernder eosinophiler Granulocyt zieht sein Lamellipodium zurück und retrahiert sich (in b). Er ist jetzt von einem breiteren Halo umgeben (H). Deutlich erkennbar die "dicken" Granula und der Zellkern (K) in Kneiferform. "blisters" an der gesamten Zellcircumferenz in c und Ausbildung eines deformierten Lamellipodium (D). In d haben sich die "blisters" (b) zurückgebildet und die Wanderung wird fortgesetzt.

In c und d oben ein wandernder neutrophiler Granulocyt.

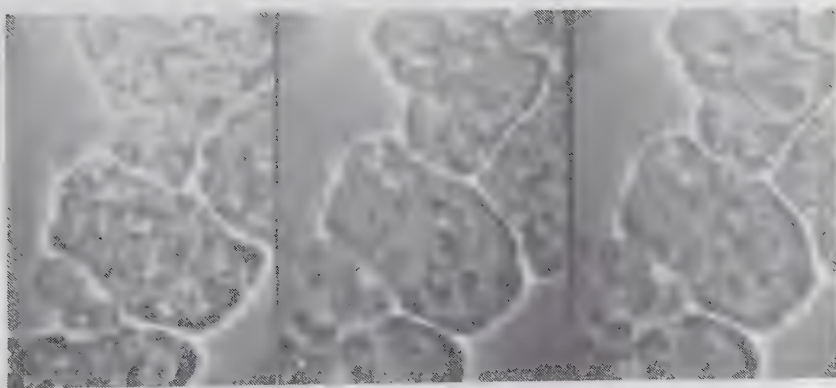
3447 gelb, CD 4 , 10^{-6} M, Beobachtungszeit 30 Minuten.



a

b

c



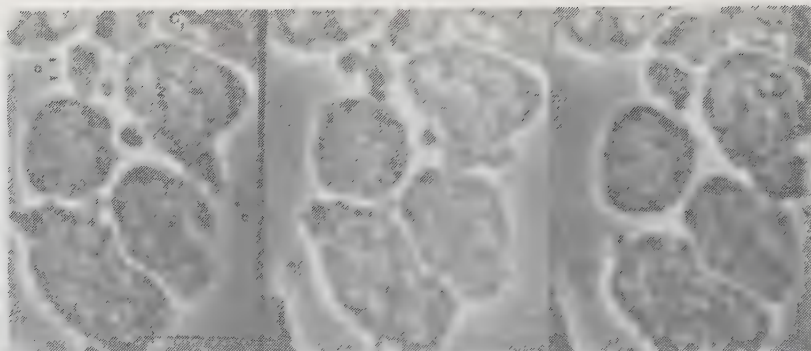
d

e

f

Abb. 25, a - f

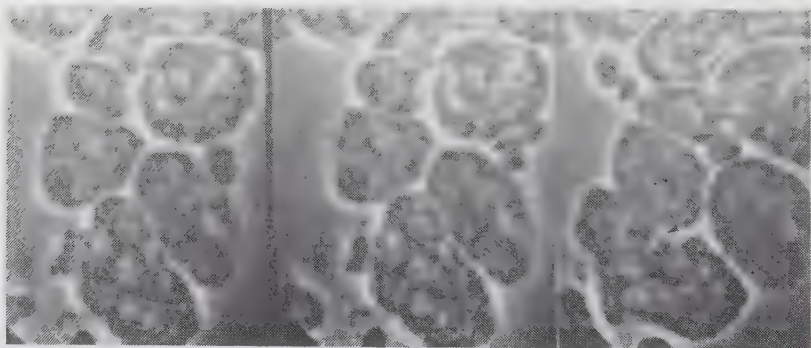
3 "gelähmte" neutrophile Granulocyten, die von einem deutlichen Halo umgeben sind. Sie haben Vakuolen (V). Es sind nur noch Granulabewegungen festzustellen. Unten ein neutrophiler Granulocyt mit Potocytose (P).
3447 gelb, CD 10⁻⁵ M, Beobachtungszeit 22 Minuten.



a

b

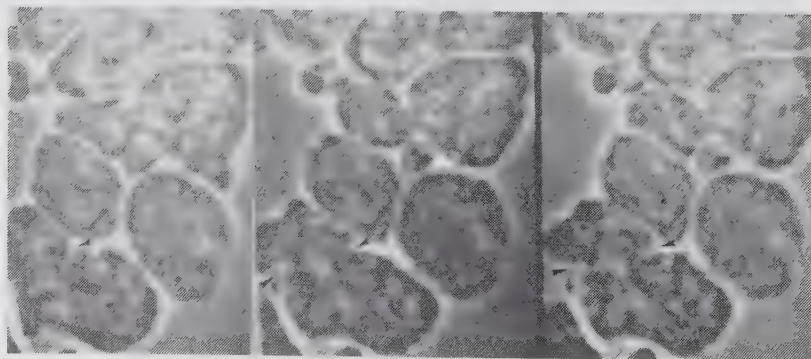
c



d

e

f



g

h

i

◀ Abb. 26, a - i

2 neutrophile Granulocyten (G_1, G_2) "blistern" (b), ein dritter (G_3) ist "gelähmt" und bildet in f eine Cytoplasma-Einschnürung aus. Die Zellstrukturen der beiden in der Mitte liegenden Zellen sind nur undeutlich erkennbar: links wahrscheinlich ein Lymphocyt, rechts ein Monocyt.

3447 gelb, $CD\ 10^{-5}$ M, Beobachtungszeit 30 Minuten. ➤ = Einschnürung

Abb. 27, a, b (unten)

Ein "gelähmter" Virocyt. Vom Aussehen her wie ein Lymphocyt Typ II oder III nach Rind, zeigt er jedoch weder Oberflächenbewegung noch Lokomotion. In der Mitte eine Plasmazelle. Oben neutrophile Granulocyten, die nur noch Granulabewegungen zeigen.

3447 gelb, $CD\ 10^{-5}$ M

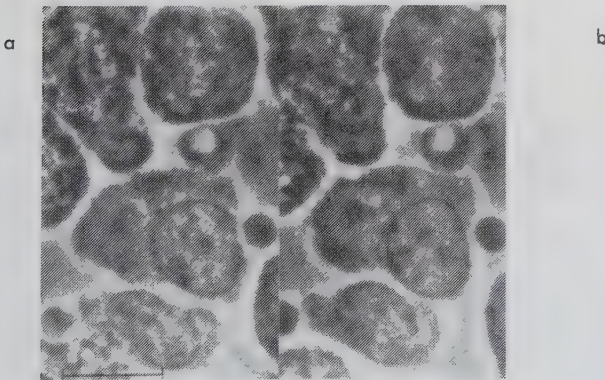


Abb. 28, a - f ➤

Cytolyse eines Monocyten (M). Links daneben ein Lymphocyt. Die 3 neutrophilen Granulocyten haben Zeichen der Zelldegeneration: Vakuolen (V), am Zellrand aufgereichte Granula (G), strukturloser trüber Zellkern (besonders in e und f) und schlauchförmige Pseudopodien (Sch).

3448 rot, $CD\ 10^{-5}$ M, Beobachtungszeit 30 Minuten.

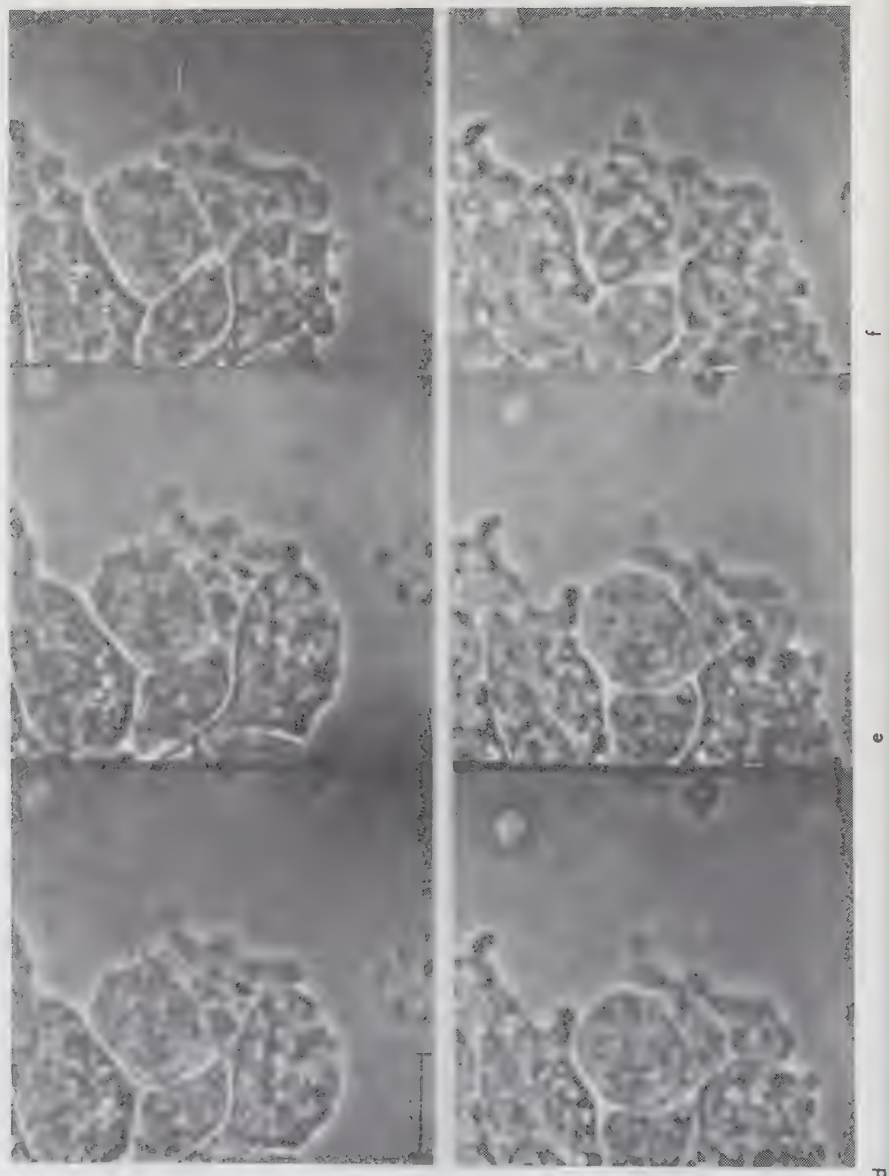


Abb. 29, a - i ➤

Ein unbeweglicher eosinophiler Granulocyt schnürt einen Teil seines Cytoplasmas ein. Es erfolgt jedoch keine Abtrennung.

In e wird eine Karyorhexis sichtbar (K). Beobachtungszeit 30 Minuten.

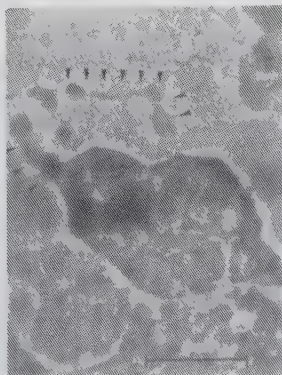
3447 gelb, $CD 2 \cdot 10^{-5} M$

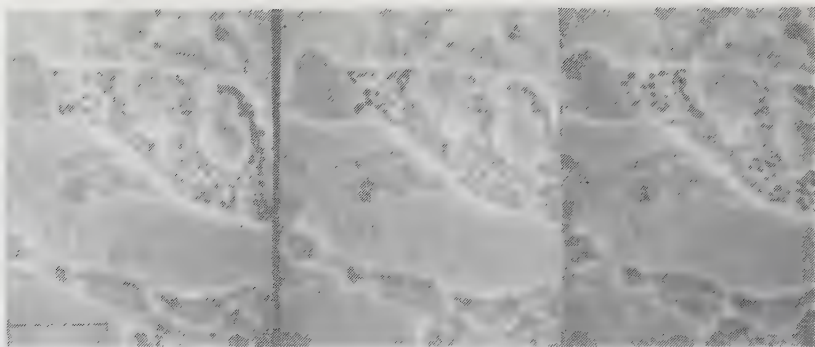
Einschnürung markiert mit Pfeilen (h)

Abb. 30

Ein neutrophiler Granulocyt hat eine "Perlenkette" ausgebildet. Granula sind darin nicht enthalten.

3447 gelb, $CD 2 \cdot 10^{-5} M$

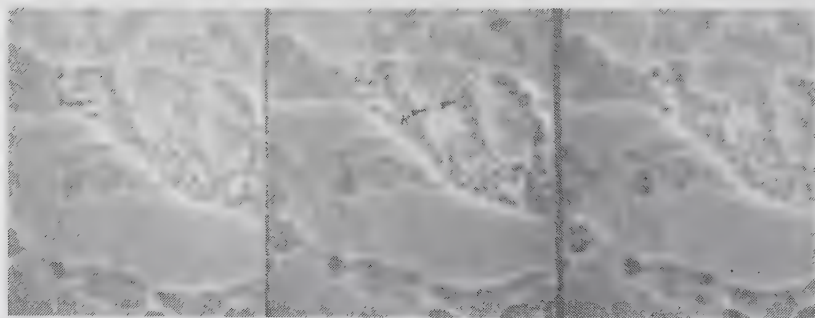




a

b

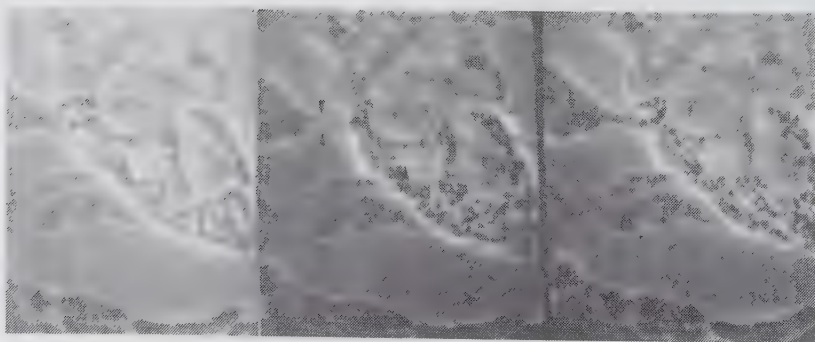
c



d

e

f



g

h

i

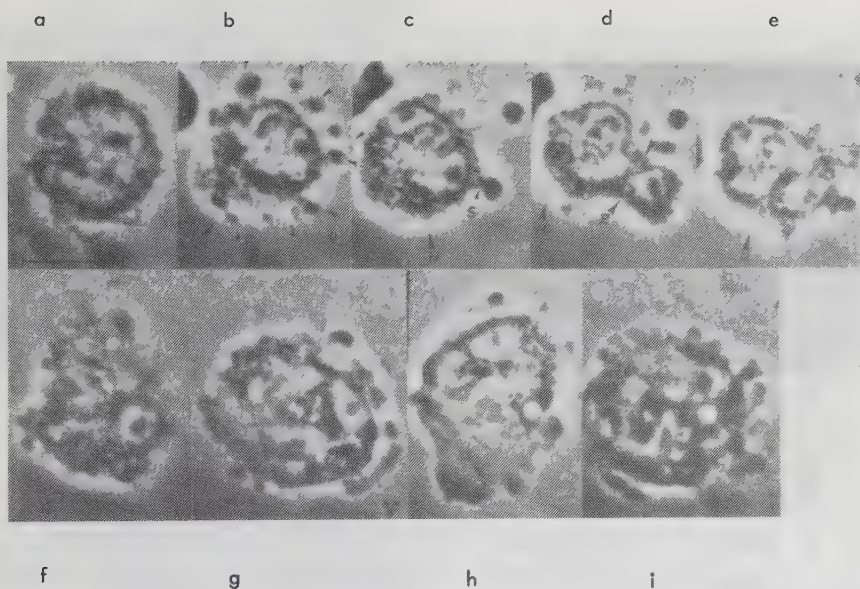
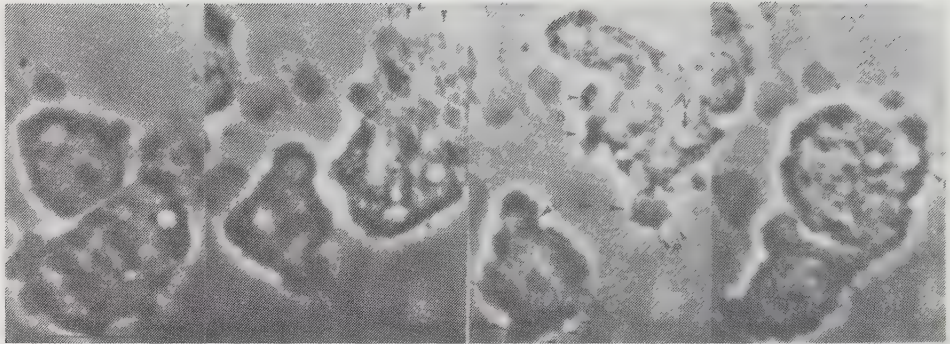


Abb. 31, a - i

Ein "blisternder" neutrophiler Granulocyt. Die "blister" (b) entstehen an der gesamten Zellcircumferenz und sitzen der Zellmembran oft mit einem Stiel (S) auf. Mitunter sind tiefe Zelleinschnürungen zu beobachten (E). Da sich die Zelle abgerundet hat, sind einzelne Zellstrukturen nur relativ unscharf zu erkennen; der Granulocyt hat ein breites Halo (H) (bes. in b - h). Beobachtungszeit 3 Minuten.
3414 gelb, CE 10^{-5} M

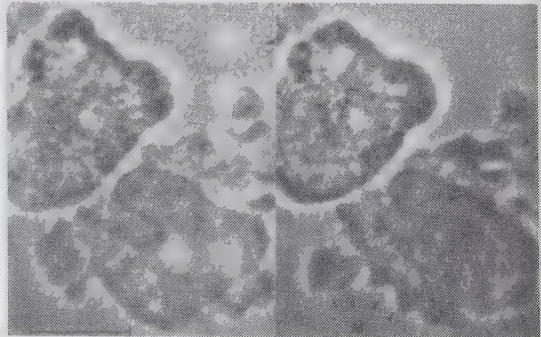


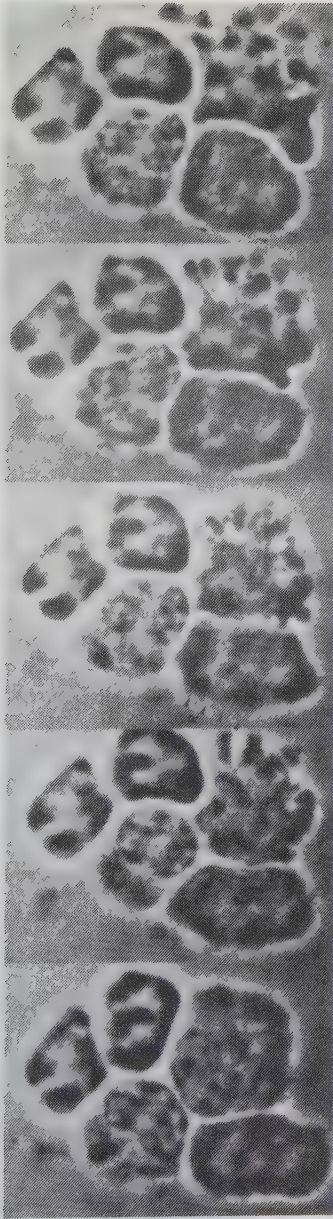
a b c d
Abb. 32, a - d

Nach wiederholter Lymphocyten-Peripolesis strömen Granula in das Lamellipodium (L) des wandernden neutrophilen Granulocyten (Typ III nach Rind) und es bilden sich "blister" (b) (in c). Der Granulocyt retrahiert sich in d. Im Halo sind deutlich Retraktionsfäden (R) zu erkennen. Im Cytoplasma mehrere Vakuolen (V). Das "bulging bleb" des Lymphocyten ist fetzenartig und es sind Retraktionsfäden im Halo zu erkennen (in c). K = Zellkern, U = Uropode
3414 gelb, CE 10^{-5} M, Beobachtungszeit 11 Minuten.

Abb. 33, a, b

Oben ein "gelähmter" neutrophiler Granulocyt, der nur noch Granulabewegungen erkennen läßt. Unten ein Monocyt mit fetzenartiger Membran (M), die letz-
hafte Bewegung zeigt. Sie enthält keine Granula.
3443 gelb, CE $2 \cdot 10^{-5}$ M
Beobachtungszeit 7 Min.





a

b

c

d

e

Abb. 34, a - e

Cytolyse eines Monocyten mit typischem bohnenförmigen Zellkern (K). Der Lymphocyt links daneben, zunächst in gestreckter Wanderform, rundet sich zunehmend ab (R = Retraktionsfäden). Darüber ein

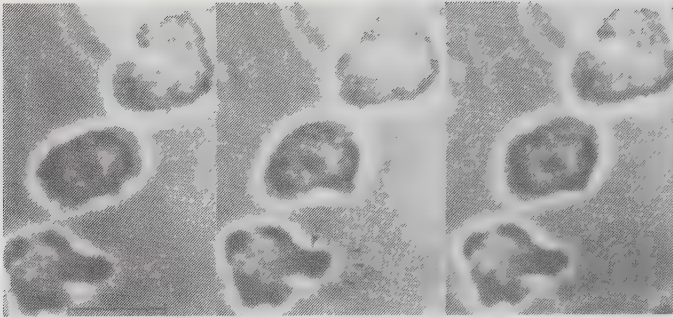
Lymphocyt vom Typ I nach Rind und 2 Erythrocyten.

3414 gelb, $CE 2 \cdot 10^{-5} M$, Beobachtungszeit 19 Minuten

Abb. 35, a - c

Oben ein Monocyt, darunter ein Lymphocyt vom Typ II nach Rind, ganz unten ein "gelähmter" Lymphocyt mit Uropodenartiger Cytoplasmavorstülpung (V) und angedeuteten Retraktionsfäden (R). Alle Zellen haben einen ausgeprägten Lichthof, sind also retrahiert.

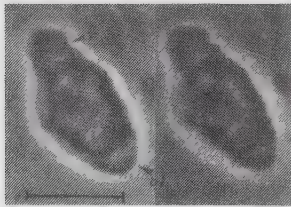
3414 gelb, $CE 2 \cdot 10^{-5} M$, Beobachtungszeit 15 Minuten



a

b

c



a

b

← Abb. 36, a, b

Ein "gelähmter" Lymphocyt mit uropoden-
artiger Cytoplasmavorstülpung (V)

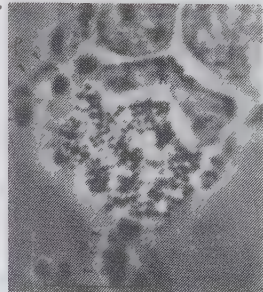
und "bulging bleb" (bl).

3429 gelb, CE 2 . $10^{-5}M$

Abb. 37

Oben 2 Lymphocyten, unten ein eosinophiler Granulocyt, alle mit Zeichen der Zellagonie. "Perlenketten" des linken Lymphocyten und des eosinophilen Granulocyten (P), die keine Granula enthalten. Die Zellgrenze des eosinophilen Granulocyten ist unscharf, der Zellkern (K) ist verdichtet (glänzender Kerntyp nach Zollinger).

3429 gelb, CE 4 . $10^{-5}M$



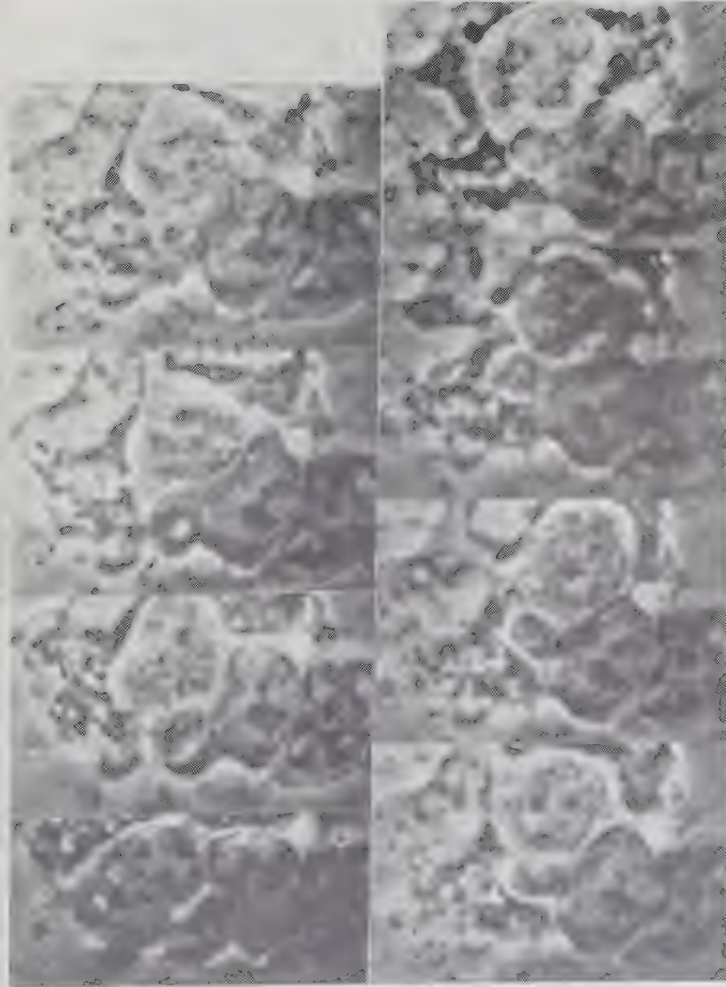
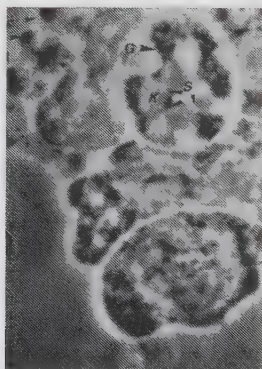


Abb. 38, a - h f h
 3 Lymphocyten: der obere und der untere "sterben" (der untere bildet dabei eine "Perlenkette", P). Der obere zeigt Kernrotation in b - f. Der Lymphocyt in der Mitte (Typ I nach Rind) phagozytiert Zellreste (Ph). Ganz oben ein "auslaufender" neutrophiler Granulocyt (N), der Potoscytosis (Pc) zeigt (in d). Auflösung der Zellmembran (A) in e. Beobachtungszeit 30 Minuten. 3429 gelb, CE 4 . 10⁻⁵M

Abb. 39

2 retrahierte neutrophile Granulocyten (mit deutlichem Halo), die nur noch Granulabewegung erkennen lassen. Darüber ein toter neutrophiler Granulocyt, fokale Granula-Anordnung (G). Der Zellkern (K) ist strukturlos (glänzender Kerntyp nach Zollinger) und stark segmentiert (S), eventuell hat eine Karyorhexis stattgefunden. Die Zellgrenzen sind nicht mehr zu erkennen. Links ein Monocyt mit degenerativen fokalen Verdichtungen der Zellmembran (F).
3429 gelb, CE 4 . 10^{-5} M



Diskussion

Die ermittelten mittleren Lokomotionsgeschwindigkeiten für neutrophile und eosinophile Granulocyten konnten durch die Bestimmung einer jeweils großen Zahl von Einzelzellgeschwindigkeiten gut abgesichert werden. Im Gegensatz zu Granulocyten befinden sich Monocyten nicht in steter Lokomotion. Die meisten beobachteten Monocyten bewegten sich innerhalb der Beobachtungszeit nicht fort, so daß nur wenige Einzelzellgeschwindigkeiten gemessen werden konnten. Wegen ihrer mitunter langen Ruhephasen konnten meist auch nur die Geschwindigkeiten weniger Lymphocyten während der begrenzten Beobachtungszeit gemessen werden. Da nur eine geringe Zahl von Meßwerten zur Verfügung steht, ist die Frage, wieviele von stimulierten und wieviele

von nicht-stimulierten Lymphocyten stammen, für die errechnete mittlere Lymphocyten-geschwindigkeit von entscheidender Bedeutung. Stimulierte Lymphocyten mit sehr hohen Wanderungsgeschwindigkeiten sind jedoch morphologisch nicht von nicht-stimulierten mit langsamerer Fortbewegung zu unterscheiden. Die starken Schwankungen der CD-Konzentrations-Geschwindigkeitskurve für Lymphocyten (Abb. 8) haben ihren Grund wohl eher in dieser Schwierigkeit, als in einer CD-Wirkung. Der im Vergleich zum Standard sehr breite 2s-Bereich, selbst bei großer Zellzahl, ist genauso zu begründen.

Warum die CE-Konzentrations-Geschwindigkeitskurve für Lymphocyten (Abb. 11) nicht ähnliche Schwankungen zeigt, bleibt allerdings unklar. Auch sind die 2s-Bereiche hier nicht breiter als beim Standard.

Die in den Standard-Präparaten ermittelte mittlere Wanderungsgeschwindigkeit für neutrophile Granulocyten entspricht mit $24,36 \mu\text{m min}^{-1}$ annähernd den aus der Literatur bekannten Werten. Für neutrophile Granulocyten wird als mittlere Wanderungsgeschwindigkeit auf halbfestem Medium bei 37°C angegeben: $40 \mu\text{m min}^{-1}$ (Moeschlin, 1946; Albrecht, 1954) aus 13, 1b, 47a, $29 - 36 \mu\text{m min}^{-1}$ (Stobbe, 1970) aus 13, $16,9 \mu\text{m min}^{-1}$ 12; für die von eosinophilen Granulocyten: $40 \mu\text{m min}^{-1}$ (Albrecht, 1954) aus 13, $19 - 40 \mu\text{m min}^{-1}$ 10, $10 \mu\text{m min}^{-1}$ 13, $7,3 \mu\text{m min}^{-1}$ 35a (Anmerkung zu 35a: Granulocyten und Monocyten wurden nicht unterschieden), und $4,7 \mu\text{m min}^{-1}$ 12.

Eosinophile Granulocyten haben nach RIND eine eindeutig geringere Wanderungsgeschwindigkeit als neutrophile Granulocyten.⁵⁹ Aus den durchgeführten Geschwindigkeitsmessungen in den Standard-Präparaten ergibt sich mit $25,23 \mu\text{m min}^{-1}$ für eosinophile Granulocyten sogar eine etwas höhere mittlere Wanderungsgeschwindigkeit als für neutrophile Granulocyten.

Pausen während der Lokomotion von Granulocyten wurden nicht beobachtet (im Gegensatz zu 35a). Die ermittelte mittlere Monocytengeschwindigkeit liegt mit $15,4 \mu\text{m min}^{-1}$ deutlich höher als in der Literatur angegeben ($7,1 \mu\text{m min}^{-1}$ 12). Wegen der geringen Zellzahl ($n = 6$) kann dieser Wert jedoch nicht als abgesichert gelten. Mit $8,99 \mu\text{m min}^{-1}$ wurde für

Lymphocyten eine relativ hohe mittlere Wanderungsgeschwindigkeit berechnet, da einige sehr schnelle Lymphocyten gesehen wurden.

Eine Actin-Polymerisationshemmung in-vitro erfolgt ab einer CD-Konzentration von $0,02 \mu\text{M}$ ($2 \cdot 10^{-8} \text{M}$) und einer CE-Konzentration von $2 \mu\text{M}$ ($2 \cdot 10^{-6} \text{M}$) nach 30 Minuten^{19,20}; bei einer CD-Konzentration von 10^{-7}M hat sich die Polymerisationsgeschwindigkeit um 25% vermindert²¹. Nach anderen Angaben wird die Polymerisation in einem CD-Konzentrationsbereich von $0,16 - 8 \mu\text{M}$ ($1,6 \cdot 10^{-7} \text{M} - 8 \cdot 10^{-6} \text{M}$) gehemmt, mit maximaler Wirkung nach 20 Minuten und maximaler Polymerisationshemmung zwischen 8 und $16 \mu\text{M}$ ($8 \cdot 10^{-6} \text{M} - 1,6 \cdot 10^{-5} \text{M}$).⁷⁴

Die in-vivo Polymerisationshemmung in stimulierten Thrombocyten ist im CD-Konzentrationsbereich von 10^{-7}M bis 10^{-6}M am ausgeprägtesten. Maximale Wirkung ist dabei schon bei der Cytochalasin-Einwirkungszeit von 3 Minuten vor der Lyse gegeben.²⁴ Andere Angaben für den "ausgeprägten" CD-Wirkungsbereich bei Thrombocyten weichen kaum von den genannten Werten ab: von 10^{-7}M bis $7,5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ starke Polymerisationshemmung, bis 10^{-6}M keine Steigerung der Hemmwirkung und erst ab 10^{-6}M wieder langsame Zunahme der Hemmung. Durch CE wird die Actin-Polymerisation in stimulierten Thrombocyten im Konzentrationsbereich von $7,5 \cdot 10^{-8} \text{M}$ bis $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ zunächst nur gering gehemmt. Zwischen den CE-Konzentrationen $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ und 10^{-6}M erfolgt "ausgeprägte" Hemmung, die bei höheren Konzentrationen noch "langsam" gesteigert wird.²⁸

Das Ausbreiten (spreading) von Megakaryocyten wird durch CD in einer Konzentration von $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($4 \cdot 10^{-6} \text{M}$) gehemmt.⁴⁰

Sowohl CD als auch CE bewirkt zunächst nur eine Änderung der Lokomotionsgeschwindigkeiten von Leukocyten, die in den in-vitro ermittelten Konzentrationsbereich mit Filamentwirkung der Cytochalasine fällt.

Durch die Blockierung des schnell wachsenden gefiederten Filamentendes wird die Actin-Polymerisationsgeschwindigkeit initial durch die größere Zahl von Nukleationszentren erhöht (initialer Anstieg der Dosis-Wirkungs-

kurve), später jedoch, wegen der nun überwiegenden Wirkung der Polymerisationshemmung, erniedrigt (H), da zunehmend kürzere Filamente für die Kontraktion zur Verfügung stehen.

Die Geschwindigkeitsabnahme erfolgt unter CD-Wirkung kontinuierlich in annähernd linearer Abhängigkeit von der Konzentration, unter CE-Wirkung abrupt mit anschließendem nahezu konzentrationsunabhängigem Bereich (außer bei eosinophilen Granulocyten). Die CD-Dosis-Wirkungskurve zeigt nach dem linearen Abfall einen "späten" Anstieg; für denselben Konzentrationsbereich wurde die konstante Polymerisationshemmwirkung in stimulierten Thrombocyten festgestellt. ²⁸

Der beschriebene Kurvenverlauf ist für alle Leukocytenarten zu beobachten, außer für Lymphocyten bei CD wegen der eingangs schon dargelegten Schwierigkeiten. Die Beobachtungszeit pro Präparat wurde aufgrund der oben zitierten Zeiten für die maximale Cytochalasinwirkung aus der Literatur auf 30 Minuten festgesetzt.

Erste Veränderungen der Zellmorphie lassen sich mit der Hemmung der Vernetzung durch die Cytochalasine erklären; diese setzt nach der Filamentwirkung ein: durch fehlende Vernetzung (Gelierung) kommt es zur Ausbildung deformierter Lamellipodien und zur Entstehung von "Löchern" im Netz, durch die Granula in das Lamellipodium einbrechen. Zeitweise kann keine Lokomotion erfolgen, da die Ausbildung eines neuen Haftpunktes über das Lamellipodium nicht gelingt; auch die Filopodienbildung zur Adhärenz dürfte gestört sein, so daß eine Retraktion der Zellen mit Abrundung erleichtert wird. Auch die undulierende Membran der Monocyten wird "zerfetzt". Die Zellretraktion fällt in denselben Konzentrationsbereich wie die Hemmung der Ausbreitung von Megakaryocyten, dem die Vernetzung zugrunde liegt (vgl. S. 18).

Fibroblasten und HeLa-Zellen retrahieren sich bei CD-Einwirkung von $0,35 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($6,6 \cdot 10^{-7} \text{M}$) nach rund 30 Minuten und zeigen Zeiosis (die in diesem Fall "blister"-Bildung entspricht, vgl. Abbildungen in 29).

Die Wanderung der "blebs" zur Zellspitze ("Kronenbildung") ist bei einer CD-Konzentration von $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (10^{-6} M) nach 5 Stunden zu beobachten. ²⁹ "Capping" von "blebs" an einer Uropoden-ähnlichen Cytoplasmavorstülpung wurde bei Fibroblasten und Mäuse-Lymphocyten bei Einwirkung von CB in einer Konzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (10^{-5} M) beobachtet. ⁷¹ Ab einer Konzentration von $CD 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ treten nach 12 Stunden Einwirkungszeit bei Fibroblasten Riesenvakuolen auf. ^{20a}

Cytochalasine hemmen die Phagocytose von neutrophilen Granulocyten und führen nach Abrundung der Zelle zur "blister"-Bildung mit zu vernachlässigender Lokomotion bei Konzentrationen von $CB 10^{-5} \text{ M}$, $CD 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ und $CE 1,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. ^{35b} Aus der hier ermittelten Dosis-Wirkungskurve ergibt sich eine etwas geringere CD-Konzentration ($1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) und eine um etwa eine Zehnerpotenz höhere CE-Konzentration (10^{-5} M) für das Auftreten von "blister".

Die Verkürzung der Mikrofilamente durch Cytochalasin könnte auch die Membran "schwäche" mit der Ausbildung von "blister"-Hernien erklären (vgl. die Begünstigung der Vesikel/Membranfusion). Möglicherweise sind die "blister" auch Ausdruck einer besonderen Membranwirkung der Cytochalasine. Unklar bleibt, warum sich einige Granulocyten lediglich retrahieren, "gelähmt" sind, andere "blistern" und phasenweise noch wandern. Ein Übergang zwischen beiden Reaktionstypen konnte nicht beobachtet werden. Da die Zahl der "blisternden" Granulocyten mit zunehmender Cytochalasinkonzentration ab, die der "gelähmten" zunimmt, ist anzunehmen, daß der Zellstoffwechsel der "gelähmten" Granulocyten so stark gestört ist, daß Zellbewegungen nicht mehr möglich sind. Gleichzeitig nimmt die Dauer der, die Wanderung unterbrechenden "blister"-Phasen für neutrophile und eosinophile Granulocyten sowohl unter CD als auch unter CE signifikant zu: zwischen $CD 1,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ und $CD 4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ nimmt die mittlere Dauer für neutrophile Granulocyten um den Faktor 6, für eosinophile sogar um den Faktor 7 zu, zwischen $CE 10^{-5}$ und $1,33 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ für neutrophile Granulocyten um den Faktor 4 (siehe Anhang und Tabelle 4, S.55).

Ein spontanes Wandern der "blister" entlang der Zellmembran konnte nicht beobachtet werden. Vielleicht können die dafür notwendigen hohen Cytochalasinkonzentrationen nicht erreicht werden, da die cytotoxische Wirkung der Cytochalasine für Leukocyten bereits bei niedrigerer Konzentration einsetzt. Auch bei längerer Beobachtungszeit bei einzelnen Präparaten kam es nicht zur "blister"-Aggregation. Nehmen die Granulocyten ihre Bewegungsform an, sind nur noch "blister" am hinteren Zellpol zu sehen (vgl. Einleitung: beim "capping" nehmen die Zellen ihre Bewegungsform an).

Ab einer Konzentration von CD $1,5 \cdot 10^{-6}$ M und CE 10^{-5} M haben viele Granulocyten Vakuolen (vgl. Abb. 13, 32). Auch diese Erscheinung läßt sich durch eine Begünstigung der Vesikel/Membranfusion bei gestörter Vernetzung erklären. Die Bildung von Riesenvakuolen wurde nicht beobachtet. Degrانulationen konnten in der doch recht kurzen Beobachtungszeit nicht gesehen werden.

Lymphocyten stülpen statt "blister" uropodenartig Cytoplasma vor (vgl. auch 71), meist gegenüber einem "bulging bleb".

Monocyten zeigen als Zeichen einer Vernetzungsstörung keine Cytoplasma-vorstülpungen, sondern ein fetzenartiges Zerreißen ihrer undulierenden Membran. (Abb. 33)

Andere Veränderungen der Zellmorphie sind Zeichen der Zellagonie oder des Zelltodes^{9,10,59}, die letztlich durch eine Schädigung der hydrophoben Zellmembran entstehen. Schwierig ist in einigen Fällen die Abgrenzung zwischen "blistern" und Potocytosis. Nach BESSIS¹⁰ lösen sich bei der Potocytosis durch eine feine dunkle Randlinie begrenzte bullae von der Zelle, ohne daß die Zellmembran dabei rupturiert. Die bullae enthalten im Gegensatz zu "blister" keine Zellorganellen (wie z.B. Granula). Auch Cytoplasmaeinschnürungen sind wahrscheinlich Degenerationszeichen.^B

Der Konzentrationsbereich, in dem die Leukocyten lediglich morphologische Veränderungen zeigen und noch beweglich sind (M), geht fließend in den cytotoxischen Bereich (C) über, so daß eine Grenzkonzentration, bei der

alle Leukocyten unbeweglich sind, nicht angegeben werden kann. Für die eindeutige Abgrenzung dieser Konzentrationsbereiche ist die Frage nach der Reversibilität der Cytochalasinwirkung zu stellen. Von reversiblen morphologischen Veränderungen wurde in einigen Publikationen berichtet. Die Reversibilität konnte mit der hier angewandten Methode nicht überprüft werden.

Bei einer Konzentration von $CD\ 4 \cdot 10^{-6} M$ wurden nur noch einzelne wandernde Granulocyten gesehen, wobei die durchschnittliche Geschwindigkeit der eosinophilen Granulocyten rund 4 mal höher lag, als die der neutrophilen. Wegen der möglichen langen Ruhephasen von Lymphocyten und Monocyten muß nicht zwangsläufig auf eine unterschiedliche "Lähmungs"-konzentration für diese Leukocytenarten geschlossen werden. Bei einer Konzentration von $CD\ 10^{-5} M$ bzw. $CE\ 2 \cdot 10^{-5} M$ wurden von keiner Leukocytenart wandernde Zellen gesehen, von allen jedoch noch einzelne intakte Zellen. Bei einer Konzentration von $CE\ 1,33 \cdot 10^{-5} M$ wurden nur noch wandernde neutrophile Granulocyten und Monocyten gesehen. CD hemmt demnach stärker die Lokomotion von neutrophilen Granulocyten, CE stärker die von eosinophilen.

Die Dosis-Wirkungskurven zeigen, daß für eine Anordnung der Cytochalasine nach ihrer Wirkungsstärke immer die Parameter Wirkung und Konzentration angegeben werden müssen. Bezüglich der Veränderung der Zellmorphie würde sich z.B. für Granulocyten LIN's Anordnung $CD \succ CE$ ergeben^{19,20,27,42}; bezüglich der Lokomotionshemmung für eine jeweilige Konzentration von $10^{-8} M$ jedoch $CE \succ CD$, da CD zu einer linearen Zunahme der Hemmwirkung, CE zu einer abrupten führt. Wegen des konzentrationsunabhängigen Bereichs der Lokomotionshemmung von CE kehrt sich diese Anordnung bei einer jeweiligen Konzentration von rund $5 \cdot 10^{-8} M$ um (vgl. auch 56). Bisher widersprüchliche Angaben in der Literatur zur Wirkungsstärke der verschiedenen Cytochalasine lassen sich so erklären.

Zusammenfassung

Die Lokomotionsgeschwindigkeit von Leukocyten wurde anhand von Phasenkontrastzeitrafferfilmen gemessen, und zwar unter "Standard"-Bedingungen und unter Einwirkung von Cytochalasin D bzw. E in steigenden Konzentrationen bis zu Konzentrationen mit cytotoxischer Wirkung.

Die Cytochalasin-Wirkungsbereiche bis zu cytotoxischer Wirkung von 10^{-9} M bis $4 \cdot 10^{-6}$ M für CD und von 10^{-9} M bis $2 \cdot 10^{-5}$ M für CE stimmen gut mit den aus der Literatur bekannten in-vitro und in-vivo Messungen überein.

Sowohl CD als auch CE beeinflussen zunächst aufgrund ihrer Filamentwirkung die Geschwindigkeit der Lokomotion. Nach initialer Beschleunigung vermindert sich die Geschwindigkeit unter CD-Wirkung linear streng konzentrationsabhängig (außer für Lymphocyten), unter CE-Wirkung bleibt sie nach abrupter Verminderung in einem weiten Bereich konstant, unabhängig von der Konzentration (außer für eosinophile Granulocyten). Die Konzentrationsbereiche sind für alle Leukocytenarten (mit den angegebenen Ausnahmen) gleich.

Die Hemmung der Vernetzung (Gelierung) durch die Cytochalasine erklärt die nach der Lokomotionshemmung auftretenden Veränderungen der Zellmorphologie. Diese Veränderungen sind je nach Leukocytenart verschieden.

Jedoch unterscheiden sich die durch CD und CE verursachten morphologischen Veränderungen nicht. Sie sind jeweils mit einem steilen Absinken der Lokomotionsgeschwindigkeit verbunden, und treten erstmals auf bei den Konzentrationen CD $1,5 \cdot 10^{-6}$ M bzw. CE 10^{-5} M. Die Dauer der "blister"-Phasen von Granulocyten nimmt bis zu einer Konzentration von CD $4 \cdot 10^{-6}$ M bzw. CE $1,33 \cdot 10^{-5}$ M um ein Mehrfaches zu. Gleichzeitig steigt die Zahl der "gelähmten" Granulocyten, ohne daß ein Übergang zwischen beiden Reaktionstypen beobachtet werden kann. Bei einer Konzentration von CD $4 \cdot 10^{-6}$ M wurden nur noch einzelne wandernde Granulocyten gesehen, wobei die mittlere Geschwindigkeit der eosinophilen rund 4 mal höher lag als die der neutrophilen. Bei einer Konzentration von CE $1,33 \cdot 10^{-5}$ M wurden nur noch wandernde neutrophile Granulocyten und Monocyten gesehen. CD hemmt demnach stärker die Lokomotion von neutrophilen, CE stärker die von eosinophilen

Granulocyten. Wegen der möglichen langen Ruhepausen von Lymphocyten und Monocyten muß nicht zwangsläufig auf eine unterschiedliche "Lähmungs-"konzentration dieser Leukocytenarten geschlossen werden. Bei einer Konzentration von $CD\ 10^{-5}M$ bzw. $CE\ 2 \cdot 10^{-5}M$ wurden von keiner Leukocytenart wandernde Zellen gesehen, von allen jedoch noch einzelne intakte Zellen. Der Übergang in den Bereich cytotoxischer Wirkung ist fließend, so daß eine Grenzkonzentration, bei der alle Leukocyten unbeweglich sind, nicht angegeben werden kann. Der cytotoxische Bereich für CD beginnt bei niedrigerer Konzentration für alle Zellarten als für CE. Die Dosis-Wirkungskurven zeigen jedoch, daß für den Vergleich der Wirkungsstärken beider Cytochalasine immer die Parameter Wirkung und Konzentration berücksichtigt werden müssen.

Neben "blister" wurden bei Granulocyten vermehrt Vakuolen im Cytoplasma gesehen, möglicherweise begründet durch eine Begünstigung der Vesikel/Membranfusion infolge Vernetzungsstörung.

Lymphocyten zeigen im "blister"-Bereich von Granulocyten uropodenartige Cytoplasmavorstülpungen, Monocyten eine fetzenartig zerrissene undulierende Membran.

Anhang

Herstellung der Lösungen:

Ausgangslösungen:

DMSO

495,6 g CD = 1 mol

495,6 g/l CD = 1 M

1 mg/l CD = $2 \cdot 10^{-6}$ M

1 mg/5 ml CD = $4 \cdot 10^{-4}$ M

507,6 g CE = 1 mol

507,6 g/l CE = 1 M

1 mg/l CE = $2 \cdot 10^{-6}$ M

1 mg/5 ml CE = $4 \cdot 10^{-4}$ M

Standardlösungen:

Verdünnungslösungen:

1:10 - Verdünnungsreihe

Verdünnung	ml Lsg./RPMI	C _M
1:2	0,1/0,1	10^{-4}
1:3	0,1/0,2	$5 \cdot 10^{-5}$
1:4	0,1/0,3	$3,3 \cdot 10^{-5}$
1:5	0,1/0,4	$2,8 \cdot 10^{-5}$
1:6	0,1/0,5	$2,4 \cdot 10^{-5}$
1:7	0,1/0,6	$2,1 \cdot 10^{-5}$

"abgeleitete" Verdünnungen

10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
$6,6 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-8}$

Standardlösungen:	5:8
(0)	0,2 ml
	0,5 ml
	+0,3 ml
	RPMI
	2,5 10^{-4}
	0,1 ml
	+0,1 ml
	RPMI
	2,1 10^{-4}

	+0,9 ml	0,1 ml	+0,9 ml	0,1 ml	+0,9 ml	0,1 ml	+0,9 ml
	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI	RPMI
	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-8}$			

Fortsetzung

"abgeleitete" Verdünnungen

Verdünnung	ml Lsg./RPM	C _M
2 : 3	0,2/0,1	
3 : 4	0,3/0,1	
3 : 8	0,3/0,5	

$1,33 \cdot 10^{-5}$

$1,5 \cdot 10^{-5}$

$1,5 \cdot 10^{-6}$

$7,5 \cdot 10^{-6}$

$7,5 \cdot 10^{-7}$

Zusammenstellung der Mikroskopdaten:

Mikroskop	Objektiv:	Abbildungsmaßstab/Apertur	Tubuslänge	Deckglasdicke	Abgleich	Okular
Leitz "gelb"	Phaco Oel	100/1,30	170	mm 0,17	45	Periplan 6x
Zeiss "rot"	Ph 3 Neofluar Oel	100/1,30	160	-	45	C 5x
Zeiss "grün"	Ph 3 Neofluar Oel	100/1,30	160	-	45	C 6,3x

Tubusfaktor: jeweils 1,25x

Objektivkorrektur im Phasenkontrast durch Grün- und Gelbfilter

Berechnung der Wanderungsgeschwindigkeit der
einzelnen Leukocyten:

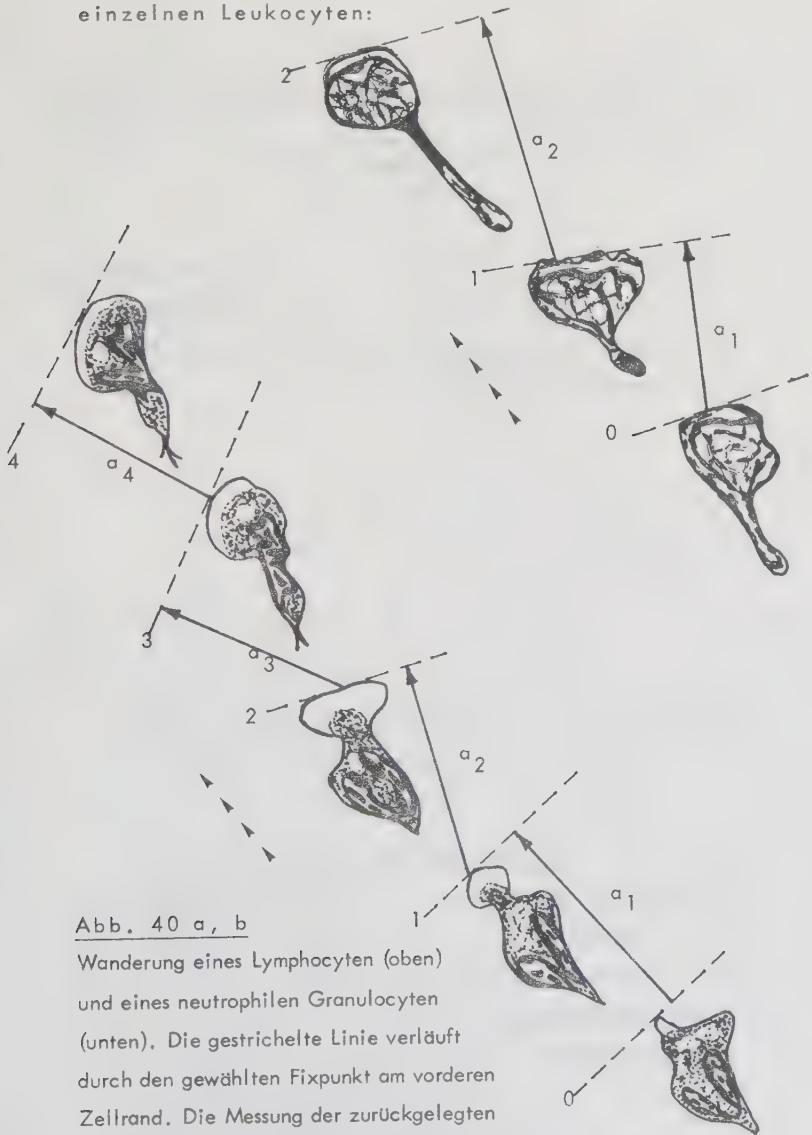


Abb. 40 a, b

Wanderung eines Lymphocyten (oben)
und eines neutrophilen Granulocyten
(unten). Die gestrichelte Linie verläuft
durch den gewählten Fixpunkt am vorderen
Zellrand. Die Messung der zurückgelegten
Strecke erfolgt jeweils bis zu diesem Punkt.

Die Bildzahl ist an der gestrichelten Linie angegeben, und beträgt in diesem
Fall 1 Bild für jede Teilstrecke.

Die zurückgelegte Gesamtstrecke a der Zelle ergibt sich aus der Summe der Teilstrecken a_1 bis a_z :

$$a = \sum_{m=1}^z a_m$$

Unter Berücksichtigung der Mikroskop-, Kamera- und Filmbetrachtervergrößerung als Faktor f ergibt sich die "wahre" zurückgelegte Strecke a_w . Die für die Strecke a_w benötigte Zeit t ergibt sich aus der Bildzahl n und der gewählten Bildfrequenz $n_{\min}$:

$$t = \frac{n}{n_{\min}}$$

Die Geschwindigkeit x berechnet sich demnach wie folgt:

$$x = \frac{a_w}{t} = \frac{f \cdot a}{\frac{n}{n_{\min}}} \left[\frac{\mu\text{m cm}^{-1} \text{ cm}}{\frac{1}{\text{min}^{-1}}} \right]$$

Der jeweilige Faktor f ergibt sich aus dem Abbildungsmaßstab:

$$M = 1 : f = 1 : \frac{1}{V_s}$$

wobei V_s die Vergrößerung des jeweiligen Gesamtsystems ist.

Die Vergrößerung des jeweiligen Gesamtsystems wurde experimentell ermittelt, indem jeweils ein Objektträger mit eingraviertem Mikrometerskala fotografiert wurde und die Projektion durch den Bildbetrachter ausgemessen wurde. Durch das Verhältnis von projizierter Strecke zur Skalastrecke ergibt sich für die einzelnen Systeme für f :

$$f (\text{"gelb"}) = 1,79 \mu\text{m cm}^{-1}$$

$$f (\text{"rot"}) = 2,54 \mu\text{m cm}^{-1}$$

$$f (\text{"grün"}) = 1,92 \mu\text{m cm}^{-1}$$

Die errechneten Einzelzellgeschwindigkeiten sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen. Die Geschwindigkeiten für Teilstrecken nach Richtungswechsel

der Zelle sind nach links eingerückt, die sich aus ihnen ergebende mittlere Geschwindigkeit steht darunter in der Kolumne. Sind unter "Patient" keine Angaben gemacht, wurde Eigenblut verwendet. Die Berechnung der standardabweichung erfolgt nach der Formel:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad [\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}]$$

dabei ist

s = Standardabweichung

x = Einzelzellgeschwindigkeit

$\bar{x}$ = Mittlere Zellgeschwindigkeit für die jeweilige Zellart bei der entsprechenden Cytochalasinkonzentration

n = Anzahl der Zellen einer Zellart, deren Geschwindigkeit bei der entsprechenden Cytochalasinkonzentration bestimmt wurde

Für die Berechnung von s für $\bar{t}$ der "blister"-Phasen ist in obiger Formel $x = t$ und $\bar{x} = \bar{t}$. In die Abbildungen sind die 2s-Bereiche eingetragen,

Die Bestimmung der Konstanten a_1 und a_0 der allgemeinen Geradengleichung $y = a_1 x + a_0$ mit $y = \bar{x}$ und $x = C_{CD}/C_E$ durch lineare Regression erfolgt nach den Formeln:

$$a_1 = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad a_0 = \frac{\sum y}{n} - a_1 \frac{\sum x}{n}$$

die des Bestimmtheitsmaßes r^2 , als Maß für die Güte der Anpassung, nach der Formel:

$$r^2 = \frac{\left[\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n} \right]^2}{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}$$

wobei n für die Zahlenpaare x/y die Anzahl ist.

Einzelzellgeschwindigkeiten von Leukocyten in Abhängigkeit von der
Cytochalasin D (CD) - Konzentration im Agar

1) neutrophile Granulocyten

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-9}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3449 rot	23,33
15 s	21
	13
	26,5
	20
	32,5
	18,67
	21,67
	24
	23
	23,5
	22
	22
	22,67
	21,33
	16,67
	26,67
	18,5
	9
	13,75

$C_{CD} \quad 10^{-8}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3461 rot	25
15 s	24,33
	29
	25,67
	21,33
	44
	20
	32
	18,75
	40
	34
	30
	32
	21,67
	16,25
	24,33
	25,5
	20
	14,67
	28,33
	18,33
	31,67

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3461 rot	17,33
15 s	47
	32,17
	22,5
	30
	26,25
	22,5
	20
	21,25

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3448 rot	13,96
10 s	9,69
	22,5
	22,5
	13
	31,25
	10,5
	14,58
	18,75
	20
	13,13

Fortsetzung	
$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr.	
Bildfrequenz	
Patient	
3448 rot	12,5
10 s	26,25
	17,5
	23,75
	20,63
	10,31
	28,13
	29,17
	30,42
	23,13
	23,75
	17,19
	42,5
	12,92
	20,63
	33,13
	21,88
	38,13
	16,25
	32,5
	28,13
	21,88
	33,33
	20,31
	30,83

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3448 rot	21,25
10 s	33,75
	27,5
	38,13
	37,5
	22,19
	33,75
	31,15
	25,63
	31,25
	40,63
	21,25
	29,69
	37,5
	37,5
	23,44
	30,47
	43,75
	34,38
	25
	38,75
	38,75
	26,88
	35,63
	31,67
	26,88
	15,94
	27,5
	21,72

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3448 rot	34,38
10 s	25
	23,13
	30,63
	28,28
	27,5
3449 rot	29
15 s	10
	24
	12,14
	31
	38,5
	24
	31,17
	16,67
	26,5
	11
	18,5
	14
	19,33
	18
	30
	26,67
	26,5
	26,58
	20
	32
	36,67
	29,56

Fortsetzung	
$C_{CD} \quad 2.10^{-8}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3449 rot	13,67
15 s	20
	23,5
	16
	19,75
	24

$C_{CD} \quad 5.10^{-8}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3460 rot	31
15 s	15,75
	36
	14,5
	25,25
	27
	11
	19
	12,86
	22
	17,43
	26,5
	9,7
	18,1
	17,67
	13,33
	15,5

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3460 rot	22
15 s	21
	11
	13,25
	11
	23,5
	19
	21,25
	11
	12
	18,25
	22,67
	26
3461 rot	23
15 s	24,5
	30
	25,83
	17,2
	16,33
	17,5
	25
	21,25
	18,25
	10,67
	14
	10
	12
	20
	20,67

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3461 rot	30
15 s	30
	30
	31,5
	30,75
	16,67
	12,67
	15,75
	20
	13
	16,5
	14,25
	13
	17
	17,67
	15,89
	17
	19,33
	18,17
	15,33
	13,67
	8,13
	12,38
	18
	15,75
	20,5
	27
	25
	17,5

$C_{CD} \quad 7,5 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3461 rot	8,44
15 s	14
	15,67
	30
	28
	45
	28
	35
	33,2
	16,75
	14,5
	22,5
	15,33
	9
	9
	20
	47
	37,5
	42,25
	15,71
	32,5
	17
	34
	13
	24,67
	27,5
	26,08

$C_{CD} \quad 10^{-7}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3449 rot	13,5
15 s	13,33
	13,42
	11
	9,67
	10,33
	16
	11,67
	11
	11,33
	16
	10
	13
	13,33
	18,33
	11,5
	13,33
	12,42
	20
	10
	20,83
	31,5
	20
	25,75

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3448 rot	16,88
10 s	12,5
	14,69
	26,25
	11,75
	10,71
	12,14
	9,82
	17,92
	11,67
	7,98
	10,63
	12,19
	20,31
	27,08
	19,69
	28,13
	8,59
	6,13
	7,36
	7,08
	18,75
	12,92
	10,42
	24,64
	12,5
	19,75

Fortsetzung	
$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3448 rot	9,11
10 s	11,11
	19,17
	7,25
	13,21
	16,25
	25
	18
	17,25
	25
	19,5
	21,25
	20,38
	29,69
	17,5
	23,59
	17,19
	12,81
	15
	18,75
	16,61

$C_{CD} \quad 3,3 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3449 rot	15
15 s	14
	15,63
	10,63
	9,2
	13
	16
	12,75
	14,38
	12
	12,5
	7,4
	13,4
	10,4
	15

$C_{CD} \quad 5 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3449 rot	17,6
15 s	8,6
	13,1
	13,4
	13,86
	24,5
	11
	18,5
	12,44
	20
	18,33
	20
	20
	13,33
	6,67
	13,2

$C_{CD} \quad 7,5 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3460 rot	13,25
15 s	16
	10
	13,08
	16
	8,33
	6,57
	10,3

Fortsetzung	
$C_{CD} \quad 7,5 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3461 rot	17,25
15 s	12,5
	11,29
	8
	8,5
	9,26
	7,5
	8,14
	8,82
	9,33
	10,17
	9,75
	8,33
	18
	11,33
	14,67
	17
	9,67
	7,25
	10,5
	23,33
	24
	23,67
	8
	16,67
	12,33
	12,4

$C_{CD} \quad 1,4 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3456 rot	17
15 s	9,5
Pat. G.	
(Herzinfarkt)	11,2
	9
	9
	15,6
	12,67
	10
	10
	10
	10
3450 gelb	15,57
15 s	19,69
	17,9
	18,8
	11,51
	6,44
	8,06
	3,4
	23,27
	10,29
	13,55
	7,9
	13,2
	12,31
	15,22
	10,61
	19,69

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3450 gelb	14,62
15 s	12,68
	15,22
	16,22
	16,71
	15,09
3449 rot	9,75
15 s	5,17
	13,44
	10
	6,24
	11
	9,8
	7,8
	10
	8,9
	6,25
	4,71
	7,9
	7

$C_{CD} \quad 1,5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3461 rot	7,88
10 s	2,1
	2,35
	2,23
	4,52

Fortsetzung	
$C_{CD} \quad 1,5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3461 rot	17,19
10 s	7,25
	5,42
	6,33
	2,2
3473 grün	14,82
10 s	11,05
	11,21
	6,49
	13,11
	9,88
	12,2
	7,98
	7,98
	11,73
	11,73
	12,87
	8,65
	8,42
	11,53
	7,41
	14,82
	15,96

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3456 rot	9,67
15 s	12,75
Pat. P.	11,33
(Apoplex)	16
	12
	16,67
	12,67
	13,78
	5,88
	3,5
3448 rot	5,77
10 s	7,5
	5,21
	6,35
	8
	5,66
	3,89
	4,78
	5,92
	5
	3,91
	7,24
	5,57
3447 gelb	4,15
10 s	3,77
	3,36
	2,22

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3447 gelb	8,62
10 s	5,37
	4,48
	6,16
	6,56
	4,03
	5,3
	6,8
	5,82
	5,73
	6,12
	6,04
	5,19
	5,62
	5,97
	7,83
	8,95
	8,39
	7,46
	4,87
	2,79
	2,39
	5,67
	1,92
	4,72
	5,88

2) eosinophile Granulocyten

$C_{CD} \quad 2,8 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3447 gelb	1,87
10 s	3,37
	2,62
	1,71
	1,94
	1,83
	3,58
	4,42
	5,29
	2,63
	1,24
	1,61
	2,56
	2,09

$C_{CD} \quad 4 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3447 gelb	3,61
10 s	4,24
	2,6
	3,01

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-9}$	
Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3449 rot	28,33
15 s	24
	26,17

$C_{CD} \quad 10^{-8}$	
Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3461 rot	45
15 s	25
	26,67
	25,83
	22
	20
	21
	26,5
	22,5
	35
	28

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3448 rot	25
10 s	10
	28,75
	19,38

Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3448 rot	28,13
10 s	30
	21,88
	26,67
	19,58
	37,5
	33,75
	30,28
	34,38
	28,75
	25
	33,75
	16,88
	14,17
	15,52
	34,58
	33,33
	43,75
	37,5
	38,19
	34,25
	31,25
	32,5
	31,88
3449 rot	40
15 s	20
	30
	25
	26,5

$C_{CD} \quad 5 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3461 rot	32
15 s	15
	23,5
	19
	17,5
	18,25

$C_{CD} \quad 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3449 rot	17
15 s	17,5

$C_{CD} \quad 3,3 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3449 rot	9,17
15 s	11,25
	10,21

$C_{CD} \quad 5 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3449 rot	10
15 s	10
	11,71
	11
	11,36
	10

$C_{CD} \quad 7,5 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3461 rot	14
15 s	18,33

$C_{CD} \quad 1,5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3473 grün	21,95
10 s	11,09
	16,52
	14,66
	12,54
	13,6
	19

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3456 rot	14,75
15 s	9,67
Pat. P.	16,75
(Apoplex)	17,5

$C_{CD} \quad 4 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3447 gelb	13,43
10 s	9,67
	6
	7,83
	5,37
	10,74
	8,06

Standard	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3448 rot	25
10 s	14,17
	13,75
	28,75
	18,89
	22,08
	23,13
	25,63
	24,38
	20
	29,17
	38,75
3449 rot	32
15 s	28,5
	30,25
3461 rot	19,67
10 s	
15 s	21

3) Monocyten

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	
3448 rot 10 s	9,96

$C_{CD} \quad 5 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	
3460 rot 15 s	1,61

$C_{CD} \quad 10^{-7}$	
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	
3449 rot 15 s	1,59 0,87 0,68 1,04

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	
3448 rot 10 s	4,2 3,8 2,08

$C_{CD} \quad 5 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	
3449 rot 15 s	3,96

$C_{CD} \quad 1,4 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	
3449 rot 15 s	0,27

Standard	
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	
3449 rot 15 s	15,67

4) Lymphocyten

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-9}$	
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	
3449 rot 15 s	6,4 5,14 19,67 12,4 13 12 12,33 11,33 12,17 13,33 8 15,33 12,22

$C_{CD} \quad 10^{-8}$	
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	
3461 rot 15 s	14,67

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	
3449 rot 15 s	8,4 4 10

Fortsetzung	
C_{CD}	$2 \cdot 10^{-8}$
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3449 rot	8,67
15 s	10,75
	9,75
	5,67
	8,71
	12,6
	12
	12,3
3448 rot	16,88
10 s	28,13
	21,88
	10
	23,75
	14,38
	13,33
	17,5
	10,63
	43,13
	7,32
	34,38
	29,38
	31,88
	21,88
	25
	23,44
	24,22

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3448 rot	37,5
10 s	8,54
C_{CD}	$5 \cdot 10^{-8}$
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3460 rot	4,13
15 s	
C_{CD}	$7,5 \cdot 10^{-8}$
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3461 rot	9,17
15 s	
C_{CD}	10^{-7}
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3449 rot	15,4
15 s	14,25
	16,67
C_{CD}	$2 \cdot 10^{-7}$
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3448 rot	6,25
10 s	

C_{CD}	$3,3 \cdot 10^{-7}$
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3449 rot	9,1
15 s	
C_{CD}	$5 \cdot 10^{-7}$
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3449 rot	23
15 s	23,67
	23,33
	23
	6
	4,6
	5,3
C_{CD}	$7,5 \cdot 10^{-7}$
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3460 rot	4
15 s	1,54
	2,9
	2,22
C_{CD}	$1,4 \cdot 10^{-6}$
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3456 rot	8
15 s	11

Fortsetzung	
$C_{CD} \quad 1,4 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3456 rot	9,5
15 s	11
Pat. G.	
(Herzinfarkt)	14,33

$C_{CD} \quad 2 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3447 gelb	2,3
10 s	

Standard	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3448 rot	9,11
10 s	14,06
	8,13
	4,38
	27
	10
3456 rot	8
15 s	7,13
Pat. P.	
(Apoplex)	10
	8,38
	11,2
	6

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3456 rot	9,33
15 s	4,17
Pat. P.	4,5
(Apoplex)	4,62
	7
	12,33
3460 rot	13,33
15 s	11,33
3461 rot	2,75
15 s	3,2
	4,8
	12

Standard neutrophile Granulocyten	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3448 rot	29,58
10 s	15,94
	11,25
	16,56
	11,88
	13,23
	17,5
	20,83
	18,75
	38,13
	13,13
	26,88
	18,75
	12,5
	17,92
	20
	16,88
	18,26
	29,17
	19,38
	25
	33,75
	30
	16,07
	24,38
	26,67

Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3448 rot	37,5
10 s	43,75
	13,96
	18,75
	31,25
	24,38
	24,38
	28,75
	27,5
	21,25
	24,38
	14,58
	22,19
	18,39
	20,83
	28,75
	24,79
	21,61
	20,63
	16,88
	15,63
	16,25
	11
	15,25
	23,33
	16,67
	20
	13,23

Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3448 rot	14,25
10 s	22,5
	27,92
	15,63
	27,5
	20,63
	24,06
	25
	26,67
	16,25
	28,13
	27,5
	27,81
	27,5
	29,17
	20
	17,5
	21,88
	30,83
	41,67
	26,25
	25
	41,67
	28,33
	41,25
	35,63
	38,44
	21,61

Fortsetzung Standard Neutrophile Granulocyten		Film-Nr. x Bildfrequenz Patient	Film-Nr. x Bildfrequenz Patient
Film-Nr. x Bildfrequenz Patient		3456 rot 32,33	3461 rot 17,67
		15 s 23,33	10 s 20,67
		Pat. P. (Apoplex)	19,17
3448 rot	17,75		35
10 s	25	21,2	22,5
	26,25	32,75	33
	29,06	28,33	30
	17,68	19,25	23
	16,88	16,25	26,5
	19,38	24,5	29,5
	12,5	35	30
	28,75	29,75	35,5
	26,25	11,5	24,33
	15	32	17,5
	11,79	13,5	18,33
	12,97	19	18,33
	21,56	30	18,33
	14,69	3461 rot 24,5	27
3449 rot	35,5	15 s 16	10
15 s	26	20,33	21,5
	24,33	18,17	20
	26,5	26	16,67
	18,57	31	17,5
	18	28,5	16,67
	20,67	22,67	17,71
	25	19	24
	26	21,67	15
		13,43	22
		28,33	

Fortsetzung	
Standard	
Neutrophile Granulocyten	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3460 rot	25
15 s	23,5
	26,5
	25
	25,75
	18,5
	28,5
	23,33
	13,8
	20,5
3468 rot	27
15 s	23,33
	35,5
	22,5
	27,11
	21,67
	37
	17,83
	14
	22,2

Einzelzellgeschwindigkeiten von Leukocyten in Abhängigkeit von der
Cytochalasin E (CE) - Konzentration im Agar

1) neutrophile Granulocyten

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-9}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3439 rot	15
10 s	27,5
	30
	24
	24
	30
	45
	45
	48
	40,5
	40
	45
	28,5
	46,5
	40
	46,5
	22,5
	45
	22,5
	33,75
	26,25
	33

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3439 rot	30
10 s	42,5
	25
	30
	37,5
	45
	40,5
	51
	45,75
	40,5
	45

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3439 rot	27
10 s	37,5
	32,25
	15,75
	43,5
	29,63
	20,25
	36

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	x
3439 rot	33,75
10 s	33,75
	35,5
	23
	18
	40
	19,88
	30
	19,5
	21
	20,25
	30,5
	26,25
	20,25
	27
	20
	19,25
	27,75
	23,5
	30
	16,67
	24,38
	33,75

Fortsetzung	
$C_{CE} \cdot 2.10^{-8}$	
Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3439 rot 27	
10 s 28,5	
	49,5
	25
	37,25
	20,63
	12
	16,32
	28,5
	28,5
	26,25
	30
	15,67
	24
	13
	10,31
	11,66
	32,5
	13,95
	17,63
	28,13
	22,5
	15
	15
	33,75
	24,38

Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3439 rot 32,5	
10 s 15	
	15
	20,83
	30
	37,5
	26,55
3413 rot 20	
15 s 11,5	
3414 gelb 15,75	
15 s 10,74	
	13,25
	7,18
	15,75
	15,57
	12,83
	10,74
	10,74
	15,51
	19,33
	19,33
	19,33
	18,38
	13,37
	7,88
	11,46
	9,67
	15,04

Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3414 gelb 10,74	
15 s 13,25	
	22,91
	22,91
	22,91
	13,6
	14,32
	15,04
	18,62

$C_{CE} \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3413 rot 13,5	
15 s 12,4	
	27,34
	16,67
	25
	40,5

$C_{CE} \cdot 1,5.10^{-7}$	
Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3444 rot 24,3	
10 s 22,5	
	17,25
	14,7
	17,5

Fortsetzung	
$C_{CE} \quad 1,5 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3444 rot	30,75
10 s	14
	22,38
	14,5
	36,38
	25
	16
	18,5
	17,25
	18
	38,25
	25
	20
	30
	25
	19
	21,75
	20,38
	31,5
	15
	33,3
	19
	26,15
	31,5
	27
	31,5

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3444 rot	24,9
10 s	27
	25,95
	33,5
	21
	26,75
	24,75
	22,5
	27,38
	24,94
	32,25
	37,5
	32,25
	34,88
	32,5
	27,38
	30,5
	31,8
	27
	47,5
	15
	31,25
	30
	22,5
	38,5
	40,5
	27
	33,75

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3439 rot	15
10 s	15,75
	25
	20
	13,25
	20
	16,8
	24,75
	13,8
	33
	30,5
	31,75
	15,5
	19,8
	17,65
	13,5
	13,5
	37,25
	24,75
	31
	15
	30
	25
	30
	27,5
	15
	25

Fortsetzung	
$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3439 rot	36
10 s	20
	28
	15
	19,25
	30
	25
	17
	17,25
	20,38
	26,85
	30
	25,75
	17,5
3442 rot	30,6
10 s	15,5
	15,3
	27
	25,5
	20,5
	15
	17,75
	28
	42
	24,75
	33,38

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3442 rot	34,2
10 s	31,5
	28
	19,5
	22,5
	18
	30
	35,63
3413 rot	27
15 s	25,67

$C_{CE} \quad 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	

3442 rot	15,3
10 s	12,88
	13,13
	19
3413 rot	23
15 s	19
	21,5
3419 rot	16
15 s	19
	17,5
	23,5

$C_{CE} \quad 1,5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3444 rot	23,25
10 s	18,75
	21,38
	14,14
	18
	20,4
	25,88
	16
	22,5
	18,3
	32
	16,5
	24,25
	16,8
	18,75
	17,78
	23
	21,9
	18,75
	22,5
	21
	16,5
	25
	13,5
	28,5
	30
	23

Fortsetzung	
$C_{CE} \quad 1,5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3444 rot	26,25
10 s	22,5
	19,5
	22,5
	21
	20
	27,5
	23,25
	34,5
	16,5
	25,5
	28,88
	20
	15,86
	26
	15,75
	19,5
	21
	20,63
	24,3
	34,5
	20,79
	25
	12
	18,5

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3444 rot	25,5
10 s	30
	31,88
	22,5
	21
	12,75
	18
	14
	11,25
	12,63
	30,38
	33
	31,69
	13,75
$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3444 rot	15,75
10 s	12,5
	17,63
	22,88
	10,5
	9,75
	13,52
	14,63
	13,94
	16,5
3442 rot	16,5

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3442 rot	4,57
10 s	11,5
	11,5
	15,14
	6,8
	13,5
	5,2
	12
	14,83
	7,2
	17,5
	12,38
	9,19
	18,75
	11,5
	17,5
	6,43
	11,97
3414 gelb	14,32
15 s	14,32
Pat. St.	
(Tibiaschaft-	8,11
fraktur re.)	8,59
	12,17
	6,8
	9,49
	17,18
	24,32
	10,74

Fortsetzung	
$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3414 gelb	26,49
15 s	20,52
Pat. St.	
(Tibiaschaft-	17,9
fraktur re.)	12,94
	12,17
3421 gelb	17,18
15 s	22,91
Pat. B.	
(Unterschenkel	12,53
fraktur li.)	18,62
	14,32
	15,75
	27,21
	19,09
	12,89
	14,32
	27,71
	18,21
	14,32
	24,7
	19,51
	19,33
	22,2
	20,77
	15,39

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3421 gelb	23,36
15 s	10,02
Pat. B.	
(Unterschenkel	16,69
fraktur li.)	7,88
	7,07
	10,02
	16,47
	8,59
	11,69
	9,31
	13,6
	11,46
	11,46
	18,62
	11,46
	7,16
	7,16
	11,1
	10,74
	10,74
	17,9
	13,13
	19,33
	12,89
	16,11
	10,74
	28,64
	19,69

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3421 gelb	7,88
15 s	15,04
Pat. B.	
(Unterschenkel	11,46
fraktur li.)	8,59
	8,59
	8,59
	8,59
	1,93
	20,05
	10,99
	5,25
	3,82
	4,54
	28,64
	11,46
	20,05
	7,07
	12,17
	9,62
	8,59

$C_{CE} \quad 5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3430 rot	14
15 s	12,5
Pat. N.	
(Herzinfarkt)	13,25

Fortsetzung	
$C_{CE} \quad 5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3430 rot	9,5
15 s	
Pat. N.	15
(Herzinfarkt)	18
	11,5
	13,67
	13,5
	12
	13,05
	15,33
	12
	13,67
	14
	14,5
	12
	13
	19
	11,5
	11,75
	14,08
	16
	12,67
	27
	25
	26
	22
	22,53
	13,5

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3430 rot	16
15 s	21,5
Pat. N.	
(Herzinfarkt)	19
	12,5
	13,67
	19
	20,5
	19,75
	16,75
	20
	16,5
	15,5
	16
	15
	13
	12
	12,5
	21,33
	19
	15
	18,44
	11
	12,33
	20,05
	19
	15
	13,75
	11,5
	8,33

Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3426 rot	18
15 s	7,5
Pat. A.	
(Apoplex)	6,11
	6,81
	5,88
	6,14
	9
	7,57
3422 rot	10
15 s	5,67
(Pat. B.	
(Unterschenkel	8,67
fraktur li.)	7,17
	16
3429 gelb	25,06
15 s	8,95
Pat. A.	
(Apoplex)	8,95
	17,9
	11,93
	5,73
	12,17
	7,88
	10,02
	12,89
	10,26
	15,75
	4,65
	5,01
	8,47
	12,89

Fortsetzung	
$C_{CE} \quad 5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3429 gelb	7,88
15 s	
Pat. A.	7,88
(Apoplex)	7,88
	7,88
	8,95
	12,89
	10,02
	14,32
	12,41
	13,6

$C_{CE} \quad 10^{-5}$	
Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3430 rot	8
15 s	
Pat. N.	7
(Herzinfarkt)	7,5
	13
	9,5
	8
	8
	8
	14,5
	8
	12,67
	8,8
	5

Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3430 rot	9
15 s	
Pat. N.	15,5
(Herzinfarkt)	12,25
	7,43
	4,65
	6,75
	2,25
	2,28
	3,64
	3,05
	9,38
Standard	
Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3439 rot	48,75
10 s	10
	29,38
	16
	26,25
	29
	22,5
	17,5
	20,63
	30
	31,5
	30
	22,5
	17
	18,75

Film-Nr. x	
Bildfrequenz	
Patient	
3439 rot	19,42
10 s	22,5
	35,25
	31,5
	39
	49,5
	44,25
	25
	24
	40,5
	45
	42,75
	26
	28,38
	27,19
	26
	45
	45
3444 rot	36,75
10 s	31,5
	27
	28,88
	34,75
	35,25
	35
	16,13
	22,5
	19,8
	26
	33

2) eosinophile Granulocyten

Fortsetzung Standard	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3444 rot	17
10 s	27
	22
	40,5
	37,5
	39
	35
	28,88
	32,5
	30,69
	30
	18,5
	32,25

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-9}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3439 rot	30
10 s	40,5
	35,25

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3439 rot	30
10 s	20
	37,5
	29,17
	36
	22,5
	33,75

$C_{CE} \quad 1,5 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3444 rot	36
10 s	

$C_{CE} \quad 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3442 rot	24
10 s	15,3
	12

Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3442 rot	16,88
10 s	15,83

$C_{CE} \quad 1,5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3444 rot	16,3
10 s	33
	26,25
	19,5
	30,3
	28,5
	29,4

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz Patient	
3414 gelb	14,32
15 s	17,32
Pat. Str. (Tibiaschaft-23,27 fraktur re.)	27,92
	25,6
3442 rot	15
10 s	

$C_{CE} \quad 5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3430 rot	15
15 s	15
Pat. N.	
(Herzinfarkt)	10,6
	14
	12,6
	13,25
	13
	8,5
	15,67
	18,25
	10,5
	9
	8,83
	14,5
	17

$C_{CE} \quad 10^{-5}$	
Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3430 rot	9
15 s	
Pat. N.	9,5
(Herzinfarkt)	10
	6
	6,5
	7
	8,5
	7,92

Standard	
Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3439 rot	37,5
10 s	15
	26,25
	30
	15
	22,5
	45
	15
	30

3) Monocyten

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3439 rot	6,25
10 s	6
	4,13
	5,07

$C_{CE} \quad 1,5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3444 rot	5,25
10 s	6,92
	5,25

$C_{CE} \quad 1,33 \cdot 10^{-5}$	
Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3443 rot	3,75
10 s	5,17
	3,64

Standard	
Film-Nr. x	Bildfrequenz Patient
3444 rot	13,2
10 s	20,25
	20,25
3439 rot	5,54
10 s	17,5

4) Lymphocyten

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-9}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3439 rot	16,5
10 s	13,5
	15
	22,5
	22,5
	18,5
	20,5
	18
	18
	18
	18
	13,5
	17,1
	18
	9,6
	13,8
	36
	30
	27,6
	33
	30,3
	30
	27
	27
	28

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-8}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3414 gelb	15,34
15 s	

$C_{CE} \quad 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3413 rot	18,34
15 s	15,56
	11,86
	22,5
	27,67
	14,17
	20,92

$C_{CE} \quad 1,5 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3444 rot	30
10 s	

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-7}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3439 rot	7,5
10 s	
3442 rot	10,3
10 s	15
	24,75
	22,5

$C_{CE} \quad 1,5 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3444 rot	16,25
10 s	13,25
	16,5
	22,88
	16,07
	15
	6,75
	6,43
	9,38
	9,64
	7,95
	9,38
	11,63

$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-6}$	
Film-Nr.	x
Bildfrequenz	
Patient	
3442 rot	16,5
10 s	
3414 gelb	12,17
15 s	22,9
Pat. St.	
(Tibiaschaft- fraktur re.)	9,31
	12,17
	14,79
	15,75
	17,9
	12,89
	15,4
	10,38

Fortsetzung		
$C_{CE} \quad 2 \cdot 10^{-6}$		
Film-Nr.	x	
Bildfrequenz		
Patient		
3414 gelb	5,73	
15 s		
Pat. St.	6,62	
(Tibiaschaft- fraktur re.)	6,18	

$C_{CE} \quad 5 \cdot 10^{-6}$		
Film-Nr.	x	
Bildfrequenz		
Patient		
3422 rot	10,4	
15 s		
Pat. B.	10,33	
(Unterschenkel fraktur li.)	11,5	
	10,92	
	9,5	
	8,5	
	6	
	6	
	3,11	
	6,67	
	4,89	
	5,67	
	8,67	
	7,17	
	7,5	
	5,83	
	6,67	

Film-Nr.	x	
Bildfrequenz		
Patient		
3422 rot	3,9	
15 s		
Pat. B.	3,86	
(Unterschenkel fraktur li.)	3,88	
	5,67	
3429 gelb	9,85	
15 s		
Pat. A.		
(Apoplex)		

$C_{CE} \quad 1,33 \cdot 10^{-5}$		
Film-Nr.	x	
Bildfrequenz		
Patient		
3443 rot	2,25	
10 s		
	0,81	
	0,55	

Standard		
Film-Nr.	x	
Bildfrequenz		
Patient		
3444 rot	10,13	
10 s		

Zeitdauer der "blister"-Phasen

CD
a) neutrophile Granulocyten

$CD \quad 1,4 \cdot 10^{-6} M$

Film-Nr.	Bild- Bildfrequenzzahl	Zeit t s
Patient		
3456 rot	3	45
15 s		
Pat. G.	5	75
Herzinfarkt	9	135
	10	150
	11	165
	7	105
	7	105
	4	60
	6	90
	9	135
	6	90
	9	135
	5	75
	6	90
	5	75
	6	90
	5	75
	7	105
	4	60
3450 gelb		
15 s	3	45
	7	105
	9	135
	4	60
	5	75

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	Bild- zahl	Zeit t s
3450 gelb 15 s	10	150
	9	135
	5	75
	7	105
	9	135
	4	60
	8	120
	4	60
	6	90
3449 rot 15 s	9	135
	7	105
	9	135
	7	105
	8	120
	5	75
	9	135
	7	105
	11	165
	9	135
n = 43	4	60
	3	45
		$\bar{t} = 101,51 \text{ s}$ $s = 34,3 \text{ s}$

CD 2 . 10^{-6} M

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	Bild- zahl	Zeit t s
3448 rot 10 s	15	150
	14	140
	16	160
	20	200

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	Bild- zahl	Zeit t s
3448 rot 10 s	25	250
	29	290
	27	270
	30	300
	27	270
3447 gelb 10 s	28	280
	25	250
	31	310
	33	330
	30	300
	29	290
	31	310
	28	280
n = 21	30	300
	27	270
	16	160
	26	260
		$\bar{t} = 255,71 \text{ s}$ $s = 58,1 \text{ s}$

CD 4 . 10^{-6} M

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	Bild- zahl	Zeit t s
3447 gelb 10 s	51	510
	64	640
	49	490
	74	740
	60	600
	69	690
	72	720
n = 7		

$\bar{t} = 627,14 \text{ s}$
 $s = 98,95 \text{ s}$

b) eosinophile Granulocyten

CD 1,5 · 10⁻⁶ M

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	Bild- zahl	Zeit t s
3473 grün 10 s	12	120
	9	90
	10	100
	12	120
	9	90
	11	110
	9	90
	9	90
	7	70
n = 10	10	100
$\bar{t} = 98 \text{ s}$ $s = 15,49 \text{ s}$		

CD 2 · 10⁻⁶ M

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	Bild- zahl	Zeit t s
3456 rot 15 s	25	375
	21	315
	13	195
n = 4	15	225
$\bar{t} = 277,5 \text{ s}$ $s = 82,61 \text{ s}$		

CD 4 · 10⁻⁶ M

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	Bild- zahl	Zeit t s
3447 gelb 10 s	74	740

CE

a) neutrophile Granulocyten

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	Bild- zahl	Zeit t s
CE 10 ⁻⁵ M		
3430 rot 15 s Pat. N (Herzinfarkt)	9 10 10	135 150 150
	15	225
	9	135
	11	165
	7	105
	15	225
	16	240
n = 10	9	135
$\bar{t} = 166,5 \text{ s}$ $s = 46,61 \text{ s}$		

CE 1,33 · 10⁻⁵ M

3430 rot 15 s Pat. N (Herzinfarkt)	29 27 40	435 405 600
	36	540
	35	525
	39	585
n = 7	39	585
$\bar{t} = 525 \text{ s}$ $s = 76,97 \text{ s}$		

b) eosinophile Granulocyten

Film-Nr. Bildfrequenz Patient	Bild- zahl	Zeit t s
CE 10 ⁻⁵ M		
3430 rot 15 s Pat. N (Herzinfarkt)	16 11 13	240 165 185
n = 3		
$\bar{t} = 200 \text{ s}$ $s = 37,75 \text{ s}$		

L i t e r a t u r

- (1) Afting, E.-G., Biochemie der Bewegung: Das Actomyosin-System, Biologie in unserer Zeit 11, Nr.1:7 - 14, 1981
- (2) Allen, R.D., Ameboid Movement aus Brachet-Miersky, The Cell, Ch.3, pp. 135 - 216, Academic Press, N.Y. 1961
- (3) Ambrose, E.J., Morphogenesis at the Cell Level, Proc. of the 1st Int. Conference on Cell Differentiation, Nice, Sept. 1971 Ed. R.Harris and D.Viza, Copenhagen, Munksgaard 1972, pp.19 - 29
- (4) Atkinson, M.A.L., Morrow, J.S., Marchesi, V.T., The Polymeric State of Actin in the Human Erythrocyte Cytoskeleton, J.Cell.Biochem. 18:493 - 505, 1982
- (5) Avnur, Z., Geiger, B., The Removal of Extracellular Fibronectin from Areas of Cell-Substrate Contact, Cell 25:121 - 132, 1981
- (6) Bandmann, U., Rydgren, L., Norberg, B., The Difference between Random Movement and Chemotaxis, Exptl.Cell Res. 88:63 - 73, 1974
- (7) Bell, L.G.E., Jeon, K.W., Stimulation of Cell Locomotion and Pseudopod Formation by Heparin, Nature 195:400 - 401, 1962
- (8) Bennett, V., The Molecular Basis for Membrane-Cytoskeleton Association in Human Erythrocytes, J. Cell.Biochem. 18: 49 - 65, 1982
- (9) Bessis, M., Das Absterben der Zellen, Triangel (Sandoz) 9, Nr.6, 1970
- (10) Bessis, M., Living Blood Cells and their Ultrastructure, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1973
- (11) Biberfeld, P., Uropod Formation in PHA Stimulated Lymphocytes, Exptl.Cell Res. 66:433 - 445, 1971

- (12) Boll, I.T.M., Domeyer, C., Moving Speed and Behaviour of Blood Leucocytes and their Precursors in the Normal and Leukemic Man, ETCS Holland, 1981
- (13) Boll, I.T.M., Granulocytopoese-Morphologie, Physiologie, Kinetik und Funktion in: Handbuch der inneren Medizin, Band II/3, Leukocytäres und retikuläres System I, herausgegeben von H.Begemann, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1976
- (14) Boxer, L.A., Richardson, S., Identification of actin-binding protein in membrane of polymorphonuclear Leucocytes, Nature 263:249 - 251, 1976
- (15) Boxer, L.A., Hedley-Whyte, E.T., Stossel, T.P., Neutrophil Actin Dysfunction and Abnormal Neutrophil Behavior, The New England Journal of Medicine 291:1093 - 1099, 1974
- (16) Boyles, J., Bainton, D.F., Changing Patterns of Plasma Membrane-associated Filaments during the initial Phases of Polymorphonuclear Leukocyte Adherence, J.Cell Biol. 82: 347 - 368, 1979
- (17) Brecher, G., On the Nomenclature of White Cell Movements, Blood Cells 2:473 - 477, 1976
- (18) Brenner, S.L., Korn, E.D., Spectrin/Actin Complex Isolated from Sheep Erythrocytes Accelerates Actin Polymerization by Simple Nucleation, Evidence for Oligomeric Actin in the Erythrocyte Cytoskeleton, J.Biol.Chem.255:1670 - 1676, 1980
- (19) Brenner, S.L., Korn, E.D., Substoichiometric Concentrations of Cytochalasin D Inhibit Actin Polymerization, Additional Evidence for a F-actin Treadmill, J.Biol.Chem.254: 9982 - 9985, 1979
- (20) Brenner, S.L., Korn, E.D., The Effects of Cytochalasins on Actin Polymerization and Actin ATPase Provide Insight into the Mechanism of Polymerization, J.Biol.Chem.255:841 - 844, 1980

- (21) Brown, S.S., Spudich, J.A., Cytochalasin inhibits the Rate of Elongation of Actin Filament Fragments, *J.Cell Biol.* 83:657 - 662, 1979
- (22) Burridge, K., McCullough, L., The Association of alpha-Actinin with the Plasma Membrane, *J.Supramol.Struct.* 13: 53 - 65, 1980
- (23) Cappuccinelli, P., Motility of living cells - (Outline studies in biology), Chapman and Hall Ltd., 1980
- (24) Casella, J.F., Flanagan, M.D., Lin, S., Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change, *Nature* 293:302 - 305, 1981
- (25) Culp, L.A., Murray, B.A., Rollins, B.J., Fibronectin and Proteoglycans as Determinants of Cell-Substratum Adhesion, *J.Supramol.Struct.* 11:401 - 427, 1979
- (26) Fischer, N., Czarnetzki, B.M., Comparative Studies on Eosinophil Chemotactic Factors during Leukocyte Migration under Agarose, *J.Invest.Dermatol.* 79:222 - 226, 1982
- (27) Flanagan, M.D., Lin, S., Cytochalasins Block Actin Filament Elongation by Binding to High Affinity Sites Associated with F-actin, *J.Biol.Chem.* 255:835 - 838, 1980
- (28) Fox, J.E.B., Phillips, D.R., Inhibition of actin polymerization in blood platelets by cytochalasins, *Nature* 292:650 - 652, 1981
- (29) Godman, G.C., Miranda, A.F., Deitch, A.D., Tanenbaum, S.W., Action of Cytochalasin D on Cells of Established Lines, III. Zeiosis and Movements at the Cell Surface, *J.Cell Biol.* 64:644 - 667, 1975
- (30) Gonnella, P.A., Nachmias, V.T., Platelet Activation and Microfilament Bundling, *J.Cell Biol.* 89:146 - 151, 1981

- (31) Haberey, M., Wohlfarth-Bottermann, K.E., Stockem, W.,
Pinocytose und Bewegung von Amöben, VI. Mitteilung,
Kinematographische Untersuchungen über das Bewegungsver-
halten der Zelloberfläche von *Amöba proteus*,
Cytobiologie 1:70 -84, 1969
- (32) Heat h, J.P., Direct evidence for microfilament-mediated
capping of surface receptors on crawling fibroblasts,
Nature 302:532 - 534, 1983
- (33) Herman, I.M., Crisona, N.J., Pollard, T.D., Relation
between Cell Activity and the Distribution of Cytoplasmic
Actin and Myosin, J.Cell Biol.90:84 - 91, 1981
- (34) Hirata, F., Axelrod, J., Phospholipid Methylation and
Biological Signal Transmission, Science 209:1082 - 1090, 1980
- (35) Hörmann, H., Fibronektin (Kälte-unlösliches Globulin),
Ein Haftfaktor für Zellen und seine Steuerung,
Hämostaseologie 1:38 - 47, 1982
- (36) Huxley, H.E., Muscular Contraction and Cell Motility,
Nature 243:445 - 449, 1973
- (37) Isenberg, G., Schubert, P., Kreutzberg, G.W., Experimental
approach to test the role of actin in axonal transport,
Brain Research 194:588 - 593, 1980
- (38) Kayserlingk, D.G., Über die Bedeutung des intracellulären
kontraktilen Systems für die Lokomotion der Fibroblasten,
Cytobiologie 1:259 - 272, 1970
- (39) Korn, E.D., Biochemistry of actomyosin-dependent cell
motility (A Review), Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:588 - 599, 1978
- (40) Leven, R.M., Nachmias, V.T., Cultured Megakaryocytes: Changes
in the Cytoskeleton After ADP-induced Spreading,
J.Cell Biol. 92:313 - 323, 1982
- (41) Lichtman, M.A., Weed, R.J., Alterations of the Cell Periphery
During Granulocyte Maturation: Relationship to Cell Function,
Blood 39:301 - 315, 1972

- (42) Lin, D.C., Lin, S., Actin polymerization induced by a motility-related high-affinity cytochalasin binding complex from human erythrocyte membrane, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76: 2345 - 2349, 1979
- (43) MacLean-Fletcher, S., Pollard, T.D., Mechanism of Action of Cytochalasin B on Actin, *Cell* 20:329 - 341, 1980
- (44) Marmé, D., Calcium, Calmodulin und ihre zelluläre Funktion, *Biologie in unserer Zeit* 11,Nr.3:71 - 77, 1981
- (45) Matsudaira, P., Mandelkow, E., Renner, W., Hesterberg, L.K., Weber, K., Role of fimbrin and villin in determining the interfilament distances of actin bundles, *Nature* 301: 209 - 214, 1983
- (46) Mattson, P., Kowal, J., The Reversibility of the Effect of ACTH and Cytochalasin B on the Ultrastructure and Steroidogenic Activity of Adrenocortical Tumor Cells in vitro, *Tissue & Cell* 15:805 - 821, 1983
- (47) Meza, I., Sabanero, M., Stefani, E., Cereijido, M., Occluding Junctions in MDCK cells: Modulation of Trans-epithelial Permiability by the Cytoskeleton, *Journal of Cellular Biochemistry* 18:407 - 421, 1982
- (48) Morris, A., Tannenbaum, J., Cytochalasin D does not produce net depolymerization of actin filaments in HEP-2 cells, *Nature* 287:637 - 639, 1980
- (49) Mousa, G.Y., Trewithick, J.R., Cytochalasin D induces capping of both leukaemia viral proteins and actin in infected cells, *Nature* 274:808 - 809, 1978
- (50) Neumeier, R., Zell-Adhäsion und Wachstumskontrolle, *Biologie in unserer Zeit* 13,Nr.2:33 - 38, 1983
- (51) Norberg, B., Rydgren, L., Söderström, N., Lymphocyte Locomotion, Morphological Criteria of the Direction of Lymphocyte Movement, *Lymphology* 6:187 - 191, 1973

- (52) Pinder, J.C., Ungewickell, E., Bray, D., Gratzner, W.B.,
The Spectrin-Actin Complex and Erythrocyte Shape,
J.Supramol.Struct.8:439 - 445, 1978
- (53) Pollard, T.D., Mooseker, M.S., Direct Measurement of
Actin Polymerization Rate Constants by Electron
Microscopy of Actin Filaments Nucleated by Isolated
Microvillus Cores, J.Cell Biol.88:654 - 659, 1981
- (54) Pollard, T.D., Weihing, R.R., Actin and Myosin and
Cell Movement, CRC Critical Reviews in Biochemistry, 1974
- (55) Queißer, W., Das Knochenmark, Morphologie - Funktion -
Diagnostik, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1978
- (56) Rampal, A.L. Pinkofsky, H.B., Jung, C.Y., Structure of
Cytochalasins and Cytochalasin B Binding Sites in Human
Erythrocyte Membranes, Biochemistry 19:679 - 683, 1980
- (57) Ramsey, W.S., Analysis of Individual Leucocyte Behavior
during Chemotaxis, Exptl.Cell Res.70:129 - 139, 1972
- (58) Richter, I.-E., Die Auswertung cytologischer Forschungs-
filme mit Hilfe der Teilbild-Analyse, Research Film 4:
224 - 229, 1962
- (59) Rind, H., Atlas der Phasenkontrasthämatalogie-,
Akademie Verlag Berlin 1958
- (60) Schliwa, M., Action of Cytochalasin D on Cytoskeletal
Networks, J.Cell Biol.92:79 - 91, 1982
- (61) Schliwa, M., Proteins Associated with Cytoplasmic Actin,
Cell 25:587 - 590, 1981
- (62) Schliwa, M., van Blerkom, J., Structural Interaction of
Cytoskeletal Components, J.Cell Biol.90:222 - 235, 1981
- (63) Scholey, J.M., Taylor, K.A., Kendrick-Jones, J., Regulation
of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent
light chain kinase, Nature 287:233 - 235, 1980

- (64) Schorlemmer, H.-U., Das Komplement System,
Die gelben Hefte XXII:49 - 59, 1982
- (65) Segawa, T., Murakami, H., Inouye, A., Tanaka, Y.,
Influences of Colchicine, Vinblastine and Cytochalasin
on the Release of 5-Hydroxytryptamine from Rat Brain
Synaptosomes, Journal of Neurochemistry 30:175 - 180, 1978
- (66) Sheetz, M.P., Spudich, J.A., Movement of myosin-coated
fluorescent beads on actin cables in vitro,
Nature 303:31 - 35, 1983
- (67) Singer, I.I., The Fibroneexus: a Transmembrane Association
of Fibronectin-Containing Fibers and Bundles of 5 nm
Microfilaments in Hamster and Human Fibroblasts,
Cell 16:675 - 685, 1979
- (68) Soranno, T., Bell, E., Cytostructural Dynamics of Spreading
and Translocating Cells, J.Cell Biol. 95:127 - 136, 1982
- (69) Stobbe, H., Bewegungsformen der Leukocyten, Phasenkontrast-
mikroskopische Studie, Med.Bild, Jg.6, H.2, 1963
- (70) Stockem, W., Wohlfahrth-Bottermann, K.E., Haberey, M.,
Pinocytose und Bewegung von Amöben, V.Mitteilung,
Konturveränderungen und Faltungsgrad der Zelloberfläche
von Amoeba proteus, Cytobiologie 1:37 - 57, 1969
- (71) Sundqvist, K.-G., Ehrnst, A., Cytoskeletal control of
surface membrane mobility, Nature 264:226 - 231, 1976
- (72) Tait, J.F., Frieden, C., Chemical Modification of Actin.
Acceleration of Polymerization and Reduction of Network
Formation by Reaction with N-Ethylmaleimide, (Iodoacetamido)
tetramethylrhodamine, or 7-chloro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole,
Biochemistry 21:6046 - 6052, 1982
- (73) Tannenbaum, J., Tanenbaum, S.W., Godman, G.C., The Binding
Sites of Cytochalasin D, II. Their Relationship to Hexose
Transport and to Cytochalasin B,
J.Cell.Physiol.91:236 - 248, 1978

- (74) Tellam, R., Frieden, C., Cytochalasin D and Platelet Gelsolin Accelerate Actin Polymer Formation. A Model for Regulation of the Extent of Actin Polymer Formation in Vivo, *Biochemistry* 21:3207 - 3214, 1982
- (75) Wang, L.-L., Bryan, J., Isolation of Calcium-Dependent Platelet Proteins that Interact with Actin, *Cell* 25:637 - 649, 1981
- (76) Wegner, A., Head to Tail Polymerization of Actin, *J.Mol.Biol.*108:139 - 150, 1976
- (77) Weiss, P., Cell Interactions, Canadian Cancer Conference, Vol.5, 1963
- (78) Wieser, R., Brunner, G., Interaktions- und Regulationsmechanismen der Zelle: Membranlektine - Membranglykomoleküle, *Biologie in unserer Zeit* 12,Nr.4:97 - 107, 1982
- (79) Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., Rundles, R.W., *Hematology*, McGraw-Hill Book Company, 2nd edition, 1977
- (80) Willingham, M.C., Ymada, K.M., Yamada, S.S., Pouyssegur, J., Pastan, I., Microfilament Bundles and Cell Shape are Related to Adhesiveness to Substratum and Are Dissociable from Growth Control in Cultured Fibroblasts, *Cell* 10:375 - 380, 1977
- (81) Zündorf, P., Pott, G., Voss, B., Gerlach, U., Fibronectin - Funktion und Klinische Bedeutung, *Herz/Kreislauf* 2:66 - 71, 1982

(29 a)

- (A) Gebäuer, H.-J., Geschwindigkeit und Grösse der Lymphocyten im Phasenkontrastzeitrafferfilm, Diss.1978 FU Berlin
Med. Fachbereiche

- (29 b) Goethe, M., Phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen an eosinophilen Granuloblasten und Granulocyten, Diss. 1975 FU Berlin Med. Fachbereiche

Nachtrag:

- (1 a) Alberts, B. Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing Inc. New York & London, 1983
- (1 b) Albrecht, M., Studien über die Leukocytenbewegung und deren Beeinflußbarkeit in vitro, Dtsch. Med. Wschr., 79:1431, 1954
- (20 a) Brett, J.G., Godman, G.C., Macrovacuolation induced by Cytochalasin: its Relation to the Cytoskeleton; Morphological and Cytochemical Observations, Tissue & Cell 16:311 - 324, 1984
- (20 b) Brett, J.G., Godman, G.C., Membrane Cycling and Macrovacuolation under the Influence of Cytochalasin: Kinetic and Morphometric Studies, Tissue & Cell 16:325 - 335, 1984
- (29 a) Goldacre, R.J., The role of the cell membrane in the locomotion of amoebae, and the source of the motive force and its control by feedback, Exp. Cell Res. (Suppl.) 8:1 - 16, 1961
- (31 a) Haemmerli, G., Felix, H., Morphologic Aspects of the Leading Lamella in Locomotive Normal and Neoplastic Blood Cells, A Study by Scanning Electron Microscopy (SEM), Blood Cells 10:23 - 36, 1984
- (35 a) Howard, T.H., Quantification of the Locomotive Behavior of Polymorphonuclear Leukocytes in Clot Preparations, Blood 59:946 - 951, 1982
- (35 b) Howard, T.H., Casella, J., Lin, S.,

Correlation of the Biologic Effects and Binding of
Cytochalasins to Human Polymorphonuclear Leukocytes,
Blood 57:399 - 405, 1981

- (37 a) Ishikawa, H. Bischoff, R., Holtzer, H.,
Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin
in a variety of cell types, J.Cell Biol. 43:312, 1969
- (39 a) Landau, J.V., Zimmermann, A.M.,
Marsland, D.A., Temperature-pressure experiments
on Amoeba proteus plasmagel structure in relation to
form and movement, J.Cell Comp.Physiol. 44:211 - 232,
1954
- (40 a) Lewis, W.H., Bull.Johns Hopkins Hosp.49:29, 1931
- (42 a) Loewy, A.G., An actomyosin-like substance from
the plasmodium of a myxomycete, J.Cell Comp.Physiol.
440:127 - 156, 1952
- (44 a) Mast, S.O., Structure, movement, locomotion
and stimulation in amoeba, J.Morphol. 41:347 - 425, 1926
- (47 a) Moeschlin, S., Ausreifungszeit, Mitosedauer,
täglicher Umsatz der granulierten Leukocyten,
Schweiz. med. Wschr. 76:1051, 1946
- (51 a) Pantin, C.F.A., On the physiology of the
amoeboid movement, J.Mar.Biol.Ass. 13:24 - 69, 1923
- (51 b) Parker, C.W., Greene, W.C., MacDonald,
H., Exp.Cell Res. 103:99 - 108, 1976
- (51 c) Philipsborn, E. v., Dtsch.Arch.klin.Med.
145:351, 1924
- (71 a) Takigawa, M., Takano, T., Shirai, E.,
Suzuki, F., Cytoskeleton and differentiation:

effects of cytochalasin B and colchicine on expression
of the differentiated phenotype of rabbit costal
chondrocytes in culture, *cell Differentiation*
14:197 - 204, 1984

- (74 a) Ts'o, P.O.P., J. Bonner, Eggmann, L.,
Vinograd, J., Observations on an ATP-sensitive
protein system from the plasmodia of myxocete,
J.Gen.Physiol. 39:325 - 347, 1956
- (80 a) Zor, U., Role of cytoskeletal organization in the
regulation of adenylate cyclase/cyclic adenosine
monophosphate by hormones, *Endocrin.Rev.* 4:1 - 21, 1983
- (21 a) de Bruyn, P.P.H., The amoeboid movement of the
mammalian leukocyte in tissue culture, *Anat.*
Rec. 95:177, 1946
- (38 a) Koch, G.L.E. in *Cell Adhesion and Motility*
(eds. Curtis, A.S.G. & Pitts, J.D.)
Cambridge University Press 425 - 444, 1980

Herrn Prof. Dr. G. Ruhenstroth,
Max-Planck-Institut für Biochemie,
Martinsried, bin ich für die Über-
lassung der Cytochalasine zu
großem Dank verpflichtet.

Frau Prof. Dr. Irene Boll danke ich
für die großzügige Unterstützung.

Frau cand. med. Cornelia Domeyer
verdanke ich die sorgfältige
Anfertigung der Fotos vom Filmmaterial.

Lebenslauf

Jürgen Lichter,
Sohn des Dr. Helmuth Lichter und seiner
Ehefrau Antonie Lichter, geb. Schüle, geboren am
21.10.54 in Mannheim. Vom
13.4.61 bis zum 31.3.63 Besuch der Katholischen Volksschule Lindener
Allee in Köln, vom
1.4.63 bis zum 31.3.66 der Michaelschule in Essen, vom
1.4.66 bis zum 1.8.66 des Humboldt Gymnasiums in Essen, vom
2.8.66 bis zum 19.7.67 des Theodor Heuss Gymnasiums in Kettwig, vom
20.7.67 bis zum 27.5.74 des Otto Hahn Gymnasiums in Saarbrücken,
und am
27.5.74 Bestehen der Abiturprüfung ebendort. Vom
1.10.74 bis zum 14.9.77 Studium der Chemie (Diplom) an der
Freien Universität Berlin und am
14.9.77 Bestehen der Vordiplomprüfung. Vom
1.10.77 bis zum 31.3.84 Studium der Humanmedizin an der
Freien Universität Berlin. Am
28.6.84 Bestehen der Ärztlichen Staatsexamensprüfung.
Seit dem
6.7.84 Approbation als Arzt.
Im Doppelstudium seit
August 1981 Studium der Anglistik mit Nebenfach Romanistik
an der Freien Universität Berlin und Bestehen der
Zwischenprüfung im
Februar 1984. Seit
Oktober 1984 Tätigkeit als Assistenzarzt.

